

Undersøgelse af omsætning og sorption af østrogenet EE2, når det udledes til Skive Fjord



Aalborg Universitet

Sektion for Miljøteknologi

Afgangsprojekt civilingeniøruddannelsen 2008

Anne Skov Olsen

Titelblad

Aalborg Universitet
Sohngaardsholmsvej 57
9000 Aalborg

Titel:	Undersøgelse af omsætning og sorption af østroget EE2, når det udledes til Skive Fjord
Projekt:	Afgangsprojekt Miljøteknologi
Projektperiode:	1. september 2007 – 24. juni 2008
Projektskriver:	Anne Skov Olsen
Vejleder:	Niels Iversen
Oplagstal:	4 stk.
Sidetall:	90 sider
Bilagsantal:	12 stk.
Synopsis:	<p>EE2 ledes fra Skive Renseanlæg via Skive Å ud i Skive Fjord. Sammenhængen mellem organisk stof og EE2 blev fundet ved bestemmelse af organisk stof i sediment fra fjorden og sammenligning med områder, hvor EE2 er blevet detekteret. Der er udført nedbrydningsforsøg med to typer sediment; et påvirket og et upåvirket. EE2 blev nedbrudt ved begge typer sediment under både aerobe og anaerobe forhold. Ved <i>in-situ</i> koncentrationer var nedbrydningsraten meget lav. Ved højere koncentrationer stimuleres nedbrydningsraten betydeligt. Ved det upåvirkede sediment skulle biomassen adaptere til EE2, det sås ved højere nedbrydningsrater ved 2. tilsætning. Der blev fundet halveringstider, $T_{1/2}$ på 0,3–365 døgn. De anaerobe forsøg fulgte <i>Michalis-Menten</i> modellen ved plot af koncentrationen af EE2 mod nedbrydningsraten. EE2 fulgte en lineær sorptionskinetik. Det befandt sig primært i vandfasen ved lave koncentrationer af organisk stof. Graden af sorption af EE2 steg med stigende koncentration af organisk stof og ved mere finkornet sediment. Alle bestemmelser af koncentrationen af EE2 er udført ved ekstraktion og derefter måling på gas kromatograf. Ved litterære studier sammenlignes EE2 med andre østrogener og østrogene stoffer og blev fundet til at være op mod 10.000 gange mere potent. Udledning af EE2 kan medføre kønsforstyrrelser hos fisk. Det vurderes derfor, at renseforanstaltninger på renseanlæggene bør udvikles således, at fjernelsen af EE2 skærpes.</p>

Forord

Projektet *Undersøgelse af omsætning og sorption af østrogenet EE2, når det udledes til Skive Fjord* er et langt afgangsprøveprojekt udarbejdet ved K-studienævnet, Aalborg Universitet. Projektet henvender sig hovedsagelig til studerende på Det Ingeniør-, Natur- og Sundhedsvidenskabelige Fakultet. Det forventes således, at læseren har en indsigt i emnet.

Prøvetagning af sediment-, fjord- og havvand er foretaget i perioden 2. januar 2008 – 9. maj 2008. Alle prøver udtaget før denne periode er anvendt til indledende testforsøg.

Referencehenvielse er udført efter Harvard-metoden. Såfremt en kilde benyttes i hele afsnittet, angives denne i slutningen af afsnittet. Bilag, der indeholder rådata og beregninger, er vedlagt på cd-rom.

Anne Skov Olsen

Indholdsfortegnelse

1 Indledning	6
1.1 Feminisering af fisk	6
1.2 Østrogens kemiske egenskaber.....	7
1.3 Nedbrydning af østrogener	8
1.4 Østrogenernes vej til miljøet.....	9
2 Problemstilling	11
3 Projektlokalitet Skive Fjord	12
3.1 Skive Renseanlæg	13
4 Nedbrydningskinetik.....	14
4.1 Biologisk nedbrydning.....	14
4.2 Biologisk nedbrydning uden vækst	14
4.2.1 <i>Michalis-Menten</i> nedbrydningsmodel.....	16
4.3 Biologisk nedbrydning med vækst	19
4.3.1 <i>Monod, med vækst</i>	20
4.3.2 Abiotisk omsætning	22
5 Sorptionskinetik.....	23
5.1 Sorption af apolære organiske stoffer	23
5.1.1 Lineær sorptions-isoterm.....	24
5.1.2 Langmuir isoterm	25
5.1.3 Freundlich isoterm	26
6 Metoder	28
6.1 Bestemmelse af østrogenindhold i sediment fra Skive Fjord.....	29
6.1.1 Bestemmelse af tørstof og glødetab.....	30
6.2 Forsøg med nedbrydning af østroget EE2.....	30
6.3 Forsøg med sorption af østroget EE2.....	32
6.3.1 Bestemmelse af kornstørrelsesfordeling	32
7 Resultater	34
7.1 Bestemmelse af østrogener i Skive Fjord.....	34
7.2 Nedbrydning af EE2.....	35
7.3 Sorption af EE2.....	40
8 Diskussion	45
8.1 Fordeling af organisk stof i Skive Fjord	45
8.2 Diskussion af nedbrydningsforsøg	45
8.3 Diskussion af sorptionsforsøg	49
8.4 Samlet diskussion	53
9 Konklusion	56
Referencer	57

Bilag 1 Standarder og standardrække.....	62
Bilag 2 Ekstraktion af østrogener	64
Bilag 3 Bestemmelse af tørstof og glødetab.....	67
Bilag 4 Nedbrydning af østrogen	69
Bilag 5 Sorption af østrogener	72
Bilag 6 Bestemmelse af kornstørrelsesfordeling og densitet.....	75
Appendiks A Gas Kromatografi	76
A.1 Opstart af gas kromatograf	76
A.2 Procedure for bestemmelse af østrogen på gas kromatograf.....	77
A.3 Beskrivelse af kolonnen	79
A.4 Gas Kromatograf – Masse Spektroskopi (GC-MS)	80
A.5 Procedure for bestemmelse af østrogen på GC-MS	81
A.6 Masse-Spektroskopi.....	81
Appendiks B Kvalitetskontrol af målinger på GC.....	83

1 Indledning

Hormonforstyrrende stoffer såsom Bisphenol A, phthalater, detergenter og østrogener har negative konsekvenser for omgivelserne, dette skyldes deres endokrine forstyrrende effekt [Bjerregaard, 2005]. Observerede kønsforstyrrelser i naturen kan kædes sammen med udledning af hunlige kønshormoner, østrogener. Renseanlæg anses for at være hovedkilden til udledningen af disse stoffer, men også udledning eller overfladestrømning fra landbrugsjord giver et bidrag [Braga *et al.*, 2005]. Den østrogene aktivitet i spildevand stammer primært fra de naturlige østron (E1) og 17 β -østradiol (E2) samt det kunstige 17 α -ethinyløstradiol (EE2). EE2 anvendes i hormonpræparater og er blandt andet det aktive stof i de fleste p-piller [Miljøprojekt no. 899, 2004], [Miljøprojekt nr. 799, 2003]. Fra kvæg, svin og høns udskilles primært E1, E2 og Østriol (E3) [Hanselman *et al.*, 2003].

1.1 Feminisering af fisk

Kønsforstyrrelser forårsaget af østrogen ses blandt andet som feminisering af hanfisk. Der er fundet eksempler i en række europæiske lande samt USA og Japan. I England er der tilfælde af feminiserede fisk adskillige kilometer nedstrøms spildevandsudledninger [Rodgers-Gray *et al.*, 2000]. I Danmark er der blandt andet set eksempler på kønsforstyrrelser hos skaller og ørreder i en række vandløb og søer i det tidligere Århus Amt [Plesner, 2003]. Feminiseringen anses som et resultat af en langsigtet eksponering og kan have forskellige udviklingsgrader fra milde til alvorlige forstyrrelser af det hanlige forplantningssystem. Tilfældene er observeret i både ferske og marine vandmiljøer [Miljøprojekt no. 729, 2002] og kan fremkomme ved koncentrationer på 1-10 ng/l af E2 og 0,1 ng/l af EE2 [Baronti *et al.*, 2000]. Feminisering af hanfisk ses blandt andet ved dannelse af blommeproteinet vitellogenin. Blommeproteinet dannes normalt i leveren hos hunfisk, herfra transporteres det til æggene og fungerer som næring til nyudklækkede fiskelarver. Bestemmelse af blommeprotein hos hanfisk anvendes ofte som metode til at påvise forurening med østrogene stoffer. Derudover kan den forskudte hormonbalance fra østrogen medføre dannelse af kønsceller hos hanfisken. Dette betyder, at der dannes æg mellem sædcellerne. Fænomenet kaldes intersex og er en abnorm form for tvekønnethed [Hansen *et al.*, 2007].

Udover de synlige resultater på østrogenforurening er der en mistanke om, at de hormonforstyrrende stoffer ligeledes har en negativ effekt på mennesker. Der er muligvis et link imellem udbredelsen af østrogener og østrogenlignende stoffer og de stigende problemer med nedsat sædkvalitet hos mænd, udbredelsen af bryst- og testikelkræft samt den faldende gennemsnitsalder for, hvornår børn går i puberteten [Xiao *et al.*, 2001].

1.2 Østrogens kemiske egenskaber

Østrogen udskilles primært fra kvinder, der er nået menstruationsalderen, og mængden afhænger blandt andet af, hvor kvinden befinder sig i sin cyklus. Mænd udskiller også en mindre mængde af østrogen svarende til, hvad kvinder udskiller efter overgangsalderen [Miljøprojekt nr. 799, 2003]. Tabel 1.1 viser den daglige udskillelse af østrogenene E1, E2 og EE2 fra mennesker.

Tabel 1.1 Daglig udskillelse af østrogenene E1, E2 og EE2 [μg] fra mennesker, efter [Ying *et al.*, 2002].

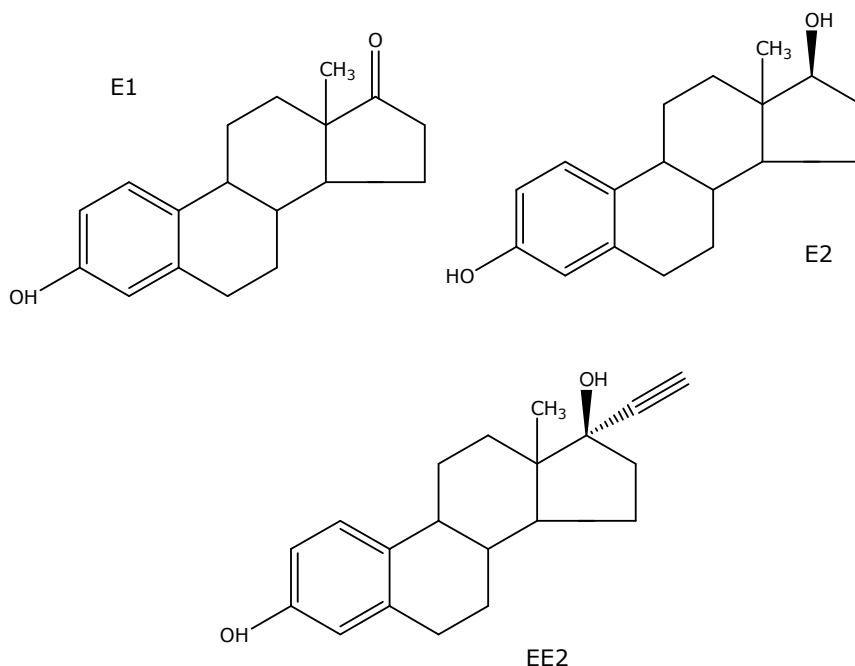
	E1	E2	EE2
Mænd	3,9	1,6	-
Menstruerende kvinder	8	3,5	-
Ikke menstruerende kvinder	4	2,3	-
Gravide kvinder	600	259	-
Kvinder	-	-	35

Østrogenene, både naturlige og kunstige, bliver hovedsageligt udskilt med urinen som inaktive polære konjugater med sulfat eller glukoronid. En mindre del bliver udskilt med fæces på ukonjugeret form. Østron, E1 kan eksempelvis udskilles som østron-3-sulfat og 17 β -østradiol, E2 kan udskilles som 17 β -østradiol-3-glukoronid [Ternes *et al.*, 1999]. Den inaktive polære form medfører, at østrogenene lettere udskilles fra kroppen via urinen. De konjugerede østrogen er 10 til 50 gange mere vandopløselige end de aktive lipofile østrogen [Ingerslev *et al.*, 2003]. Tabel 1.2 viser nogle af de kemiske egenskaber ved østrogenene E1, E2 og EE2.

Tabel 1.2 Kemiske egenskaber ved E1, E2 og EE2 efter [Ying *et al.*, 2002]

Kemiske navn	Molekylvægt	Vandopløselighed [mg/l] ved 20° C	Damptryk [mm Hg]	Log K_{ow}
Østron, E1	270,4	13	$2,3 \times 10^{-10}$	3,43
17 β -østradiol, E2	272,4	13	$2,3 \times 10^{-10}$	3,94
17 α -ethyløstradiol, EE2	296,4	4,8	$4,5 \times 10^{-11}$	4,15

Ud fra tabel 1.2 fremgår det, at østrogenene har en lav vandopløselighed især det kunstige østrogen EE2. Desuden indikerer det lave damptryk, stoffernes lave flygtighed. Oktanol/vand fordelingskoefficienten, log K_{ow} viser, at østrogenene er hydrofobe. Figur 1.1 viser den strukturelle opbygning af E1, E2 og EE2.



Figur 1.1 Strukturel opbygning af Østron, E1, 17β-østradiol, E2 og 17α-ethyløstradiol, EE2. Lavet efter [Lee *et al.*, 2003].

Figur 1.1 viser, at østrogenene strukturelt ligner hinanden, og de forskelle som er, forekommer ved D-ring strukturen. For E2 gælder det, at hydroxyl-gruppen, som sidder på D-ring strukturen, kan vende opad eller nedad. Når hydroxyl-gruppen vender opad, betegnes stoffet 17β-østradiol, hvis hydroxyl-gruppen vender nedad, betegnes stoffet 17α-østradiol [Hanselman *et al.*, 2003].

For de biologiske egenskaber er der en forskel i det østrogene aktivitetsniveau. Det østrogene aktivitetsniveau måles med udgangspunkt i aktiviteten af E2, som sættes til 1. For E1 gælder det, at den østrogene aktivitet ligger helt op til 1000 gange lavere end E2. Til gengæld ligger aktiviteten for EE2 1,2 gange højere end E2. Den østrogene aktivitet kan dermed rangeres således; EE2 > E2 >> E1 [Lee *et al.*, 2003].

1.3 Nedbrydning af østrogen

Østrogen udskilt fra mennesker føres via afløbssystemet til renseanlægget. På renseanlægget medfører især den aktive slam proces, at op mod 85 % af østrogenene fjernes inden det rensede spildevand ledes ud til recipienten. I afløbssystemet samt på renseanlægget forekommer imidlertid enzymer eller mikroorganismer, der er i stand til at omdanne de konjugerede østrogen til ukonjugerede og mere aktive østrogen. Dette har givet eksempler på, at der er fundet flere østrogen på den aktive form i udløbsvandet fra renseanlægget, end der var i indløbsvandet [Kuster *et al.*, 2004].

Shi *et al.*, 2002 har med EE2 udført en række batch-forsøg med aktiv slam under aerobe forhold. Forsøgene viste, at kun 20 % af EE2 var fjernet efter 24 til 48 timer. For E1 og E2 gælder det, at der sker en relativ hurtig fjernelse. E2 fjernes hurtigst idet denne oxideres til E1. Fjernelsen af E1 sker imidlertid lidt langsommere og i varierende grad [Miljøprojekt no. 899, 2004].

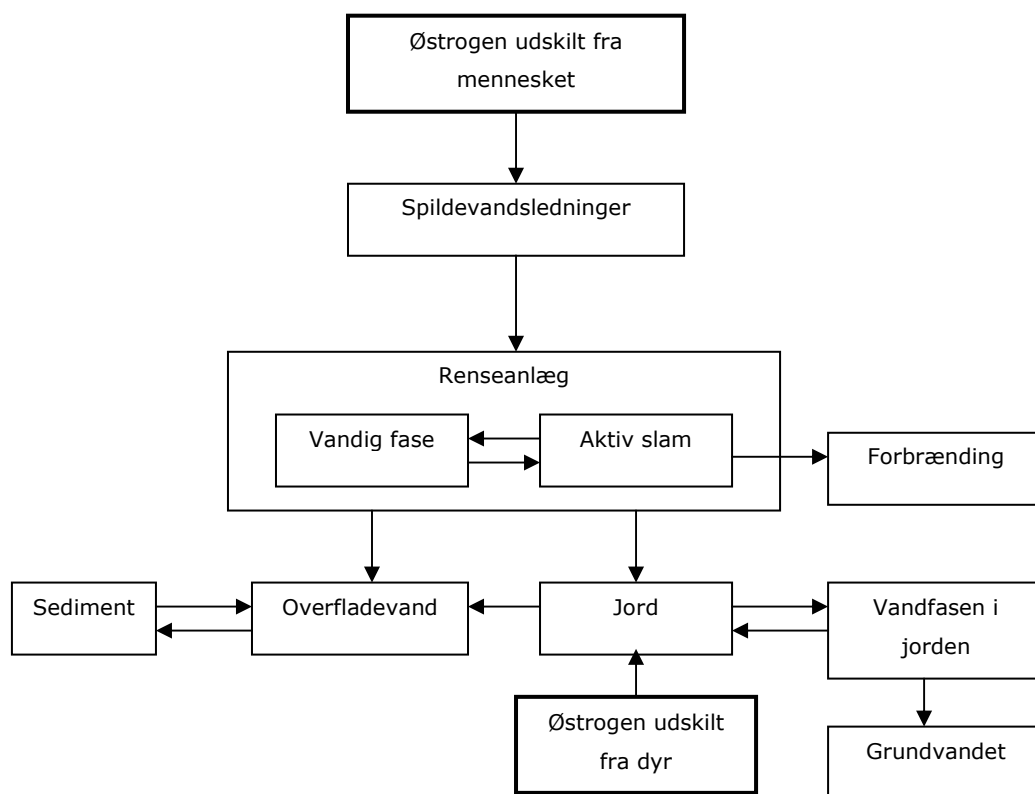
Ved undersøgelse af nedbrydningsrater er det fundet, at for ferskvand ses en større nedbrydningsrate end for salt- eller brakvand. Det kan skyldes, at saltindholdet inhiberer de mikroorganismer, som nedbryder østrogenene. Det er desuden fundet, at nedbrydning under anaerobe forhold enten foregår meget langsomt eller slet ikke finder sted [Kuster *et al.*, 2004].

Ligesom andre phenoler vurderes østrogen, at kunne oxideres abiotisk. Der er set sammenhænge mellem en reduktion af Fe og Mn samtidig med en oxidation af phenoler [Hanselman *et al.*, 2003].

Når østrogenene fjernes fra den vandige fase er det uklart, om det primært skyldes en biologisk nedbrydning, eller om der primært er tale om sorption til partikler eller lignende. Nogle studier viser, at i renseanlægget sker den primære fjernelse ved biologisk nedbrydning, hvorimod i den vandige recipient sker den primære fjernelse via sorption. Der er imidlertid andre studier, som viser, at den primære fjernelse af østrogen fra den vandige fase sker ved sorption både på renseanlægget og i recipienten. Desuden er det vist, at desorption spiller en betydelig mindre rolle end sorption til sedimentet. Der er fundet, at fordelingskoefficienten for desorption ligger to til tre gange lavere end fordelingskoefficienten for sorption. Dette betyder, at koncentrationen af østrogen i sedimentet antages at stige over tid [López de Alda *et al.*, 2002].

1.4 Østrogenernes vej til miljøet

For at skabe et overblik over hvor det er muligt at detektere østrogene stoffer, viser figur 1.2 en oversigt over, ad hvilke veje østrogen fra mennesker og dyr kan tilføres miljøet.



Figur 1.2 Diagram over tilførslen af østrogener til miljøet. Efter [Ingerslev *et al.*, 2003]

Diagrammet i figur 1.2 illustrerer tilførslen af østrogener til miljøet. Skæbnen for de menneskelige østrogener afhænger først og fremmest af, hvilken form de befinder sig på i renselanlægget. Det afgørende er, om de er aktive eller konjugerede. De aktive apolære østrogener sorberes overvejende til slammet på renselanlægget, herfra kan de sendes til forbrænding og bliver dermed destrueret. De menneskelige østrogener kan imidlertid også ende i jorden. Det sker ved de tilfælde, hvor slammet fra renselanlægget anvendes som gødning på marker. I Danmark er det oftest således, at når slammet anvendes som gødning, så har det forinden været opbevaret på aktive slam anlæg i op til 10 år. Det betyder, at østrogener og andre skadelige stoffer i slammet forekommer i begrænset omfang, og slammet overholder de lovpligtige udledningskrav [Skive.dk, 11.04.08].

For de inaktive polære konjugater er forekomsten på renselanlægget primært i den vandige fase. Når de polære østrogener føres med vandfasen til recipienten, kan en de-konjugering medføre, at de efterfølgende sorberes til sedimentet.

Østrogener fra dyr ender også i jorden, når gylle fra dyrene spredes som gødning på marker. Herfra kan østrogenerne via vandfasen i jorden ledes videre til grundvandet [Kuster *et al.*, 2004]. Desuden kan østrogenerne tilføres vandmiljøet ved overfladeafstrømning fra marken til eksempelvis grøfter og dræn.

2 Problemstilling

Der udledes østrogen fra renseanlæg i store dele af verden. En del af disse ender i recipienten, hvor de kan udgøre en skade på det omgivende miljø. Det er blandt andet kommet til udtryk ved feminisering af fisk, hvor blandt andet forekomst af intersex hos hanfisk er en af konsekvenserne [Hansen *et al.*, 2007]. Østrogenene på renseanlæggene er udskilt fra mennesker og primært kvinder. Der udledes både naturlige og kunstige østrogen, hvor de kunstige blandt andet stammer fra p-piller og andre hormonpræparater [Miljøprojekt no. 899, 2004]. Østrogenene kan udledes på en aktiv og apolær form eller på en konjugeret og polær form [Ternes *et al.*, 1999]. Dette har betydning for, om østrogenet primært vil befinde sig i vandfasen eller sorberet til partikler. I recipienten er det et spørgsmål, om østrogenet forekommer i sedimentet eller i vandfasen.

Blandt østrogenene har det kunstige 17 α -ethyløstradiol, EE2 den største østrogene aktivitet. Den skadelige virkning på miljøet opstår allerede ved koncentrationer ned til 0,1 ng/l. Desuden er EE2 sværere nedbrydeligt, det fjernes kun begrænset under processerne på renseanlægget [Shi *et al.*, 2002].

Når østrogenet er udledt på aktiv form, kunne det være interessant at undersøge, hvor det vil forekomme i recipienten. Med udgangspunkt i dette undersøges således:

Hvad er konsekvensen for østrogen, specielt det kunstige 17 α -ethyløstradiol, når det udledes til en recipient, hvor recipienten er en dansk fjord?

Der vil herunder blive set på følgende:

- Sammenhængen mellem det organiske indhold i sedimentet og mængden af østrogenene E1, E2 og EE2.
- Nedbrydnings-kinetikken for EE2, herunder forskelle ved Aerobe og Anaerobe forhold og forskelle ved sediment fra et østrogenpåvirket område og sediment fra et østrogenupåvirket område. Desuden undersøges nedbrydnings-kinetikken for EE2 efter en eksponeringsperiode for biomassen.
- Sorptions-kinetikken for EE2 i forhold til koncentrationen af EE2, organisk indhold i sedimentet og varierende salinitet.

3 Projektlokalitet Skive Fjord

Skive Fjord er valgt som projektlokalitet, den fungerer som recipient for Skive Renseanlæg. Skive Fjord udgør en del af Limfjordssystemet, som er Danmarks største fjordområde [Limfjord.dk, 07.04.08]. Skive Fjord ligger i Region Midtjylland og eneste større by i forbindelse med fjorden er Skive by. Figur 3.1 viser placeringen af Skive Fjord i forhold til Limfjordssystemet. Fjorden er markeret med en rød cirkel, og Skive by er markeret med en sort prik.



Figur 3.1 Placering af Skive Fjord i forhold til hele Limfjordssystemet. Fjorden er markeret med en rød cirkel, og Skive by er markeret med en sort prik.

Limfjorden modtager saltvand fra både den vestlige ende ved Thyborøn og den østlige ende af fjorden ved Hals. Fra vest har saltvandet en salinitet på 32-34 ‰, og fra øst er saliniteten 19-25 ‰. Vindpåvirkning samt tidevand medfører en netto vandstrøm gennem Limfjorden fra Thyborøn til Hals på 6,8 km³ pr. år [Limfjord.dk, 07.04.08].

Skive Fjord er en lavvandet fjord, knap en tredjedel har en vanddybde på 0-2 meter [Bech, 2003]. Skive Fjord udgør et areal på 911 km² [Madsen *et al.*, 2003]. Det gennemsnitlige salinitetsniveau i fjorden kan variere mellem 20 ‰ og 25 ‰ [Rasmussen *et al.*, 2001]. Oplandet til Skive Fjord består primært af opdyrket land, derudover er der naturområder og bebyggelse. Bebyggelsen består hovedsagelig af Skive by [Madsen *et al.*, 2003]. Dele af Skive Fjord har ligesom andre områder i Limfjorden problemer med tilfælde af iltsvind. Dette sker typisk om sommeren eller først på foråret, og for Skive Fjord er det især på de dybe områder over 4 meter, som rammes [Bech, 2003].

Skive Å udgør den primære tilførsel af ferskvand til Skive Fjord, den har en vandføring på ca. 366 m³ pr. sekund [DMU.dk, 11.04.08]. Udover Skive Å sker der en mindre tilførsel af ferskvand til fjorden fra Dommerby Å og fra drænen i forbindelse med landbrug. Figur 3.2 viser udløbet af Skive Å, der er markeret med en rød cirkel.



Figur 3.2 Skive Fjord, hvor udløbet fra Skive Å er markeret med en rød cirkel.

3.1 Skive Renseanlæg

Skive Renseanlæg udleder det rensede spildevand til Skive Å. Udledningen sker cirka 500 meter opstrøm åens udløb til Skive Fjord og ligger på omtrent 0,1 m³ pr. sekund [Skive.dk, 11.04.08]. Renseanlægget belastes med ca. 56.250 PE og er dimensioneret til at modtage spildevand fra 123.000 PE. Det modtager ca. 5.868.242 m³ spildevand pr. år fra Skive by og oplandet omkring Skive by [MST.dk, 11.04.08].

Renseanlægget er traditionelt opbygget med riste, sand og fedtfang. Derefter følger en procestank med simultanfældning, hvor kvælstoffjernelsen sker efter recirkulationsprincippet. Afslutningsvis er der efterklaringstanke samt en iltningstrappe. Det overskydende slam fra anlægget pumpes til et biologisk slam anlæg. Slammet bliver her opkoncentreret dels på grund af afvanding men også på grund af den biologiske omsætning af det organiske stof i slammet. Slutproduktet er som tørvemuld og bruges til spredning på landbrugsjord [Skive.dk, 11.04.08].

4 Nedbrydningskinetik

Der sker en omsætning og nedbrydning af de fleste organiske stoffer i naturen. Nedbrydningen eller omsætningen kan foregå både abiotisk eller biotisk af eksempelvis bakterier. I de fleste tilfælde har den biologiske nedbrydning kvantitativt den største betydning i forhold til den abiotiske nedbrydning [Bjerregaard, 2005].

4.1 Biologisk nedbrydning

De organiske stoffer anvendes af biomassen i deres syntese eller som energikilde. Der kan skelnes imellem primær nedbrydning og fuldstændig omsætning eller mineralisering. Ved primær nedbrydning ændres stoffet fra et organisk stof til et andet. Ved fuldstændig omsætning eller mineralisering er slutprodukterne uorganiske forbindelser [Bjerregaard, 2005].

Hvis det organiske stof er fremmed for biomassen, omsættes det kun langsomt eller slet ikke. Det skyldes, at bakterierne skal adaptere til det fremmede stof, hvorefter nedbrydningen sker hurtigere. Et stof defineres som umiddelbart bionedbrydeligt, hvis det nedbrydes uden en periode til adaption [Bjerregaard, 2005].

Hastigheden for nedbrydning af organiske stoffer kan variere. Variationen opstår blandt andet ved ændringer af temperatur men også ved en række miljømæssige faktorer. Det kan være koncentrationen af stoffet og typen af biomasse i miljøet. Desuden er stoffets struktur afgørende for, hvor let det nedbrydes [Alexander, 1999], [Bjerregaard, 2005].

Ved at plote fjernelsen af det organiske stof over en tidsperiode, vil formen af dette plot blandt andet være en funktion af de ovenstående faktorer. Plottet illustrerer nedbrydningskinetikken for det organiske stof. Hvis det organiske stof er et fremmed stof, kan nedbrydningskinetikken for dette være en nyttig viden til estimering af, hvor længe stoffet forventes at forekomme i naturen og hvilke koncentrationer, det forekommer i over en tidsperiode. Ud fra dette kan det fremmede stofs skadelighed overfor omgivelserne vurderes [Alexander, 1999].

4.2 Biologisk nedbrydning uden vækst

Der eksisterer en række modeller for biologisk nedbrydningskinetik for organiske stoffer. Modellerne forekommer både som empiriske og teoretiske. En empirisk model er eksempelvis power rate modellen;

$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C^n \quad (4.1)$$

hvor

C = koncentrationen af organisk stof [mg L^{-1}]

K = nedbrydningsratekonstanten [h^{-1}]

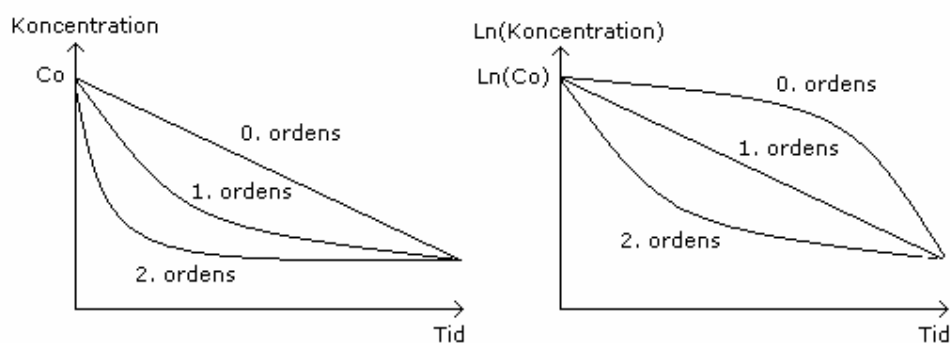
n = empirisk konstant [-]

Ved at variere k og n kan modellen fittes til målte data og anvendes som en approksimation af nedbrydningskinetikken. Modellen er baseret på, at fjernelsen af organisk stof er proportional med potensen af organisk stof. Når n er lig med 0 i en model er der tale om en 0. ordens kinetik. Dette forekommer i de tilfælde, hvor fjernelsen af det organiske stof er uafhængig af koncentrationen [Alexander, 1999].

Ved tilfælde, hvor n er lig med 1, er der tale om en 1. ordens kinetik. Der opnås en god approksimation, når nedbrydningshastigheden alene kontrolleres af koncentrationen af det organiske stof, og der samtidig ikke forekommer vækst af biomasse [Alexander, 1999].

Når n er lig med 2 er der tale om 2. ordens kinetik. Ved 2. ordens eller højere orden af nedbrydningskinetik er der en langsommere nedbrydning af det organiske stof ved lavere koncentrationer end eksempelvis ved en 1. ordens kinetik. Denne form af modellen anvendes ved forekomst af flere typer organiske stoffer [Alexander, 1999], [Kjærgaard & Ringsted, 1998].

Figur 4.1 viser formen af en nedbrydningskurve ved 0.-, 1.- og 2. ordens kinetik. Kurverne er vist både ved et regulært plot og ved et semi-logaritmisk plot.



Figur 4.1 Regulært og semi-logaritmisk plot af 0.-, 1.- og 2. ordens kinetik, efter [Alexander, 1999].

Power rate modellen er anvendelig ved sammenligning af forskellige typer af nedbrydningskinetik, men parametrene i modellen k og n er fremkommet ud fra et fit og ikke ud fra fysiske eller kemiske parametre. Et eksempel på en model, hvor parametrene kan bestemmes ud fra fysiske eller kemiske forhold, er *Michalis-Menten* modellen.

4.2.1 Michalis-Menten nedbrydningsmodel

Michalis-Menten modellen er teoretisk, og den viser relationen imellem nedbrydningsraten og koncentrationen af substrat eller organisk stof. Michalis-Menten modellen;

$$v = \frac{v_{\max} \cdot C}{K_M + C} \quad (4.2)$$

hvor

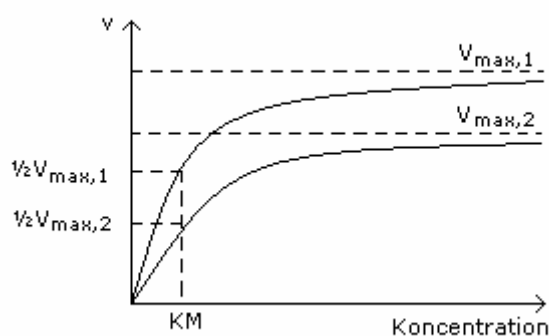
v = specifik nedbrydningsrate [h^{-1}]

v_{\max} = maksimal specifik nedbrydningsrate [h^{-1}]

K_M = Michalis-Menten konstant [$\text{mg substrat L}^{-1}$]

C = koncentrationen af substrat [mg L^{-1}]

Nedbrydningsraterne er benævnt specifikke, da de er afhængige af mængden af biomasse. Michalis-Menten konstanten, K_M definerer koncentrationen af substrat ved det punkt, hvor nedbrydningsraten, v er det halve af den maksimale nedbrydningsrate, v_{\max} [Alexander, 1999]. Michalis-Menten er som sagt en teoretisk model, der er baseret på en række antagelser. Den bygger på forsøg med rene kulturer af bakterier, hvor der kun forekommer et substrat, som skal nedbrydes, og der sker ingen vækst af biomasse. Derudover antages det, at der ingen barrierer forekommer mellem substrat og biomasse. Ved disse omstændigheder ses det, at nedbrydningsraten stiger i takt med tilførslen af mere substrat [Alexander, 1999]. Figur 4.2 viser to eksempler på den specifikke nedbrydningsrate som funktion af koncentrationen af substrat. Eksempel nummer 1 har en højere v_{\max} -værdi end eksempel 2, dette skyldes mængden af biomasse ved eksempel 1 er større end ved eksempel 2.



Figur 4.2 Relationen mellem specifik nedbrydningshastighed, v og koncentrationen af substrat eller stof. Relationen er vist ved to eksempler, hvor eksempel 1 indeholder en større mængde biomasse end eksempel 2. Efter [Loll & Moldrup, 2000].

Det fremgår af figur 4.2, at K_M er den samme for begge kurver, dette skyldes, at K_M er afhængig af typen af bakterie og ikke mængden af biomasse [Loll & Moldrup, 2000].

Michalis-Menten modellen (4.2) kan også skrives som en differential ligning, da den specifikke nedbrydningsrate, v kan antages at være det samme som raten for fjernelse af substrat;

$$\frac{dC}{dt} = v = -\frac{v_{\max} \cdot C}{K_M + C} \quad (4.3)$$

Ved at se på en af kurverne i figur 4.2 kan der skelnes mellem tre dele af kurvens forløb. Der er et område, hvor koncentration af substrat, C er lig med Michalis-Menten konstanten, K_M det vil sige hvor $C = K_M$. Ydermere er der et område, hvor koncentrationen af substrat, C er meget større end K_M , $C \gg K_M$. Ligeledes ses et område, hvor koncentrationen af substrat, C er meget mindre end K_M , $C \ll K_M$ [Alexander, 1999].

Ved at betragte det område af kurven hvor koncentrationen af substrat, C er lig med K_M ses det, at den specifikke nedbrydningsrate, v er afhængig af koncentrationen af substrat. Nedbrydningskinetikken i dette område kan udtrykkes ved en omskrivning af (4.3);

$$\frac{dC}{dt} = \frac{k_2 \cdot C}{K_M + C}$$

hvor

$$k_2 = V_{\max} \cdot B_0$$

B_0 = densiteten af biomassen ved $t = 0$ [antal celler ml^{-1}]

Denne form af modellen betegnes *Monod* uden vækst kinetik. Betegnelsen *uden vækst* anvendes, da Monod normalt er udtryk for omsætning af organisk stof samtidig med vækst af biomasse. Et plot af Monod uden vækst giver en kurve, som ligger sig imellem en 0.- og 1. ordens nedbrydningskinetik [Alexander, 1999]. Forløbet af en 0.- og 1. ordens nedbrydningskinetik kan ses af figur 4.1.

I det tilfælde, hvor koncentrationen af substrat, C er meget større end K_M , kan ligning (4.3) omskrives til;

$$\frac{dC}{dt} = -v_{\max} \quad (4.4)$$

Her er en situation hvor den specifikke nedbrydningsrate, v er uafhængig af substratkoncentrationen. Det betyder, at ligningen nu repræsenterer en mere simpel 0. ordens nedbrydningskinetik. Forløbet af en 0. ordens nedbrydningskinetik fremgår af figur 4.1. Nedbrydningsforløbet ved 0. ordens nedbrydningskinetik antages som sagt at ske uden vækst af biomasse. Der forekommer dog tilfælde, hvor nedbrydningen sker samtidig med vækst. Det kan eksempelvis være, hvis et næringsstof optræder som begrænsende faktor, men bliver tilgængeligt i en begrænset rate. Hermed sker fjernelsen af substratet i takt med tilførslen af næringsstof. Det samme princip ses i det tilfælde, hvor ilt er den begrænsende faktor ved aerob nedbrydning i vandige miljøer [Alexander, 1999].

Sidste område af kurveforløbet i figur 4.2 er det tilfælde, hvor koncentrationen af substrat, C er meget mindre end K_M . Her er nedbrydningsraten, v meget afhængig af koncentrationen af substrat, C. Ligning (4.3) kan omskrives til;

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{v_{\max}}{K_M} \cdot C \quad (4.5)$$

I det område af kurveforløbet er nedbrydningsraten, v afhængig af koncentrationen af substrat, C. Dette giver ved et plot af koncentrationen af substrat, C mod tiden et kurveforløb som følger en 1. ordens nedbrydningskinetik. Parametrene v_{\max} og K_M er begge konstanter og ligning (4.5) kan skrives som;

$$\frac{dC}{dt} = -K_1 \cdot C \quad (4.6)$$

hvor

$K_1 = 1.$ ordens ratekonstant [h^{-1}]

Konstanten, K_1 angiver andelen af substrat, der nedbrydes pr. tid. Der er tale om en eksponentiel nedbrydningsfunktion [Alexander, 1999]. Ved integrering af ligning (4.6) fås den endelige ligning for substratkoncentrationen, C som funktion af tiden, t;

$$C = C_0 \cdot e^{(-K_1 \cdot t)} \quad (4.7)$$

I de tilfælde, hvor substratet er et uønsket fremmed stof i naturen, er det belejligt at kende stoffets halveringstid, $T_{1/2}$. Denne halveringstid er derfor ofte at finde i litteraturen, men sjældnere kendes ratekonstanten, K_1 . Sammenhængen mellem halveringstiden, $T_{1/2}$ og ratekonstanten, K_1 er;

$$K_1 = \frac{\ln(2)}{T_{1/2}} \quad (4.8)$$

En model med 1. ordens nedbrydningskinetik er den mest anvendte i praksis. Dette skyldes blandt andet at forholdene ved in-situ målinger ofte opfylder de forhold som typisk giver en 1. ordens nedbrydning. Substratet eller det fremmede stof forekommer typisk i ret fortyndede koncentrationer, ligeledes er biomassen sjældent særlig stor. Forholdet mellem biomasse og substrat er i øvrigt lille. Ydermere er 1. ordens nedbrydningsrater for en lang række stoffer tilgængelige i litteraturen, derfor benyttes disse ofte [Alexander, 1999].

For nedbrydning af organisk stof findes også modeller, hvor nedbrydningen sker samtidig med en vækst af biomasse.

4.3 Biologisk nedbrydning med vækst

En model for biologisk nedbrydning med vækst er som nævnt *Monod* ligningen. Monod ligningen er ligesom Michalis-Menten modellen teoretisk. Ligningen for Monod skrives således;

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot C}{K_m + C} \quad (4.9)$$

hvor

μ = specifik vækstrate [h^{-1}]

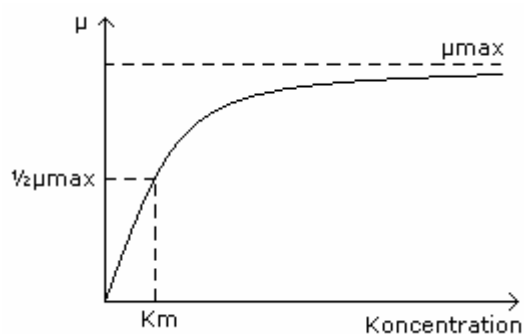
μ_{\max} = maksimal specifik vækstrate [h^{-1}]

K_m = halvmætningskonstanten [$\text{mg substrat L}^{-1}$]

C = koncentrationen af det fremmede stof eller substrat [mg L^{-1}]

Monod ligningen bygger på samme princip som Michalis-Menten, her er blot nedbrydningsraten, v og Michalis-Menten konstanten, K_m erstattet med henholdsvis vækstrate, μ og halvmætningskonstant, K_m [Alexander, 1999].

Nedbrydningen af organisk stof sker enten ved, at biomassen anvender stoffet som energikilde eller i syntesen. Nedbrydningen kan også være en bieffekt fra nedbrydning af andre stoffer [Alexander, 1999], [Maier *et al.*, 2000]. Da modellen er teoretisk, er den skabt ud fra visse betingelser. Det antages imidlertid, at biomassen anvender stoffet som energikilde samt i syntesen. Andre essentielle uorganiske næringsstoffer forekommer i overskud. Det antages, at det fremmede stof eller substrat ikke er toksisk, og det er vandopløseligt. Nedbrydningen sker desuden under aerobe forhold. Det betyder, at vækstraten vil stige i takt med, at substrat tilføres [Alexander, 1999], se figur 4.3.



Figur 4.3 Specifik vækstrate som funktion af koncentrationen af substrat. Efter [Alexander, 1999].

Halvmætningskonstanten, K_m repræsenterer biomassens evne til at nedbryde substratet. Det vil sige en lav værdi af K_m indikerer, at biomassen er i stand til at vokse hurtigt ved lave koncentrationer af substrat, den har en god affinitet overfor substratet [Alexander, 1999], [Maier *et al.*, 2000].

Ved Monod ligningen er det muligt ligesom ved Michalis-Menten modellen at se på tre dele af kurvens forløb i figur 4.3. Der er et område, hvor koncentration af substrat, C er lig med halvmætningskonstanten, K_m det vil sige hvor $C = K_m$. Her er den specifikke vækstrate, μ til dels afhængig af koncentrationen af substrat. Derudover ses et område, hvor koncentrationen af substrat, C er meget mindre end K_m , $C \ll K_m$. I dette område er vækstraten, μ meget afhængig af substratkoncentrationen. Ligeledes er der et område, hvor koncentrationen af substrat, C er meget større end K_m , $C \gg K_m$. Her er den specifikke vækstrate, μ nærmest uafhængig af substratkoncentrationen [Alexander, 1999].

4.3.1 Monod, med vækst

Når $C = K_m$ kan Monod ligningen, (4.9) også udtrykkes i form af en differential ligning, hvor der tages højde for mængden af biomasse, denne ligning betegnes *Monod, med vækst*;

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{k_{\max} \cdot X \cdot C}{K_m + C} \quad (4.10)$$

hvor

k_{\max} = maksimal specifik nedbrydningsrate [mg substrat (mg biomasse · h)⁻¹]

X = koncentrationen af biomasse [mg biomasse L⁻¹]

Sammenhængen mellem den maksimale specifikke nedbrydningsrate, k_{\max} og den maksimale specifikke vækstrate, μ_{\max} kan udtrykkes ved at indføre den effektive udbyttekonstant, $Y_{C/X}$. Sammenhængen kan udtrykkes således;

$$k_{\max} = \mu_{\max} \cdot Y_{C/X} \quad (4.11)$$

hvor

$Y_{C/X}$ = effektiv udbyttekonstant [mg substrat (mg biomasse)⁻¹]

Den effektive udbyttekonstant angiver den mængde af substrat, der forbruges i forhold til produktionen af biomasse. Koncentrationen af biomasse, X som forekommer i ligning (4.10) kan udtrykkes ved følgende ligning;

$$X = X_0 + \frac{(C_0 - C)}{Y_{C/X}} \quad (4.12)$$

Når denne ligning (4.12) for koncentrationen af biomasse indsættes i ligningen for Monod med vækst (4.10) fremkommer det udtryk for Monod med vækst som oftest anvendes;

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{\max} \cdot C}{K_m + C} \cdot (X_0 \cdot Y_{C/X} + C_0 - C) \quad (4.13)$$

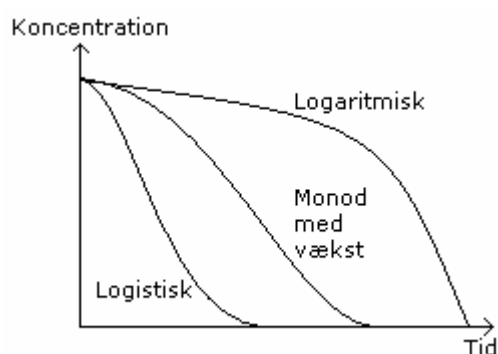
Det er tidligere nævnt, at en del af kurvens forløb i figur 4.3 har et område, hvor koncentrationen af substrat, C er meget mindre end K_m , $C \ll K_m$. I dette område var vækstraten, μ meget afhængig af substratkoncentrationen og ligning (4.13) kan omskrives til;

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{\max} \cdot C}{K_m} \cdot (X_0 \cdot Y_{C/X} + C_0 - C) \quad (4.14)$$

Denne ligning (4.14) betegner en situation, hvor der er nedbrydning med logistisk vækst. Det sidste område på kurveforløbet i figur 4.3 er det tilfælde, hvor koncentrationen af substrat, C er meget større end K_m , $C \gg K_m$. Her er den specifikke vækstrate, μ nærmest uafhængig af substratkoncentrationen. I dette tilfælde kan ligning (4.13) omskrives til;

$$\frac{dC}{dt} = -\mu_{\max} \cdot (X_0 \cdot Y_{C/X} + C_0 - C) \quad (4.15)$$

Ovenstående ligning (4.15) benyttes ved situationer, hvor der er nedbrydning med logaritmisk vækst [Alexander, 1999]. Figur 4.4 viser kurveforløbene for de tre situationer, Monod med vækst, logistisk vækst og logaritmisk vækst.



Figur 4.4 kurveforløbet ved nedbrydning med logaritmisk og logistisk vækst samt Monod med vækst, efter [Alexander, 1999].

Ved nedbrydning af organisk stof i det naturlige miljø kan en række faktorer medføre, at kurveforløbene får en anden form end i teorien. Alle ovenstående eksempler er teoretiske modeller, bortset fra den empiriske power rate model. Eksempler på faktorer, der kan indvirke på kurveforløbene, er blandt andet det tilfælde, hvor det fremmede stof eller substrat har en inhiberende effekt på nedbrydningen. Desuden kan der være andre substrater tilstede i miljøet, som biomassen har en større affinitet over for. Det vil sige, et substrat som er mere biotilgængeligt, og biomassen vil nedbryde dette før det fremmede stof. Imidlertid er der tilfælde, hvor det fremmede stof kan blive nedbrudt sideløbende med det primære substrat. Derudover kan der være diffusionsbarrierer, som har indflydelse på kontakten mellem biomassen og det fremmede stof. Hvis det fremmede stof sorberer til partikler, kan det være sværere tilgængeligt

for bakterierne. De ovennævnte naturlige faktorer er vigtige at overveje ved anvendelse af modeller til bestemmelse af nedbrydningskinetik [Alexander, 1999].

4.3.2 Abiotisk omsætning

Organiske stoffer kan også nedbrydes ved en abiotisk omsætning. Omsætningen kan foregå på baggrund af fire processer; hydrolyse, oxidation, reduktion og fotokemisk omsætning. Ved hydrolyse sker der en reaktion imellem vand og det organiske stof. Ved abiotisk oxidation kræver det, at der forekommer oxiderende stoffer i tilstrækkelige høje koncentrationer. Et oxiderende stof kan eksempelvis være ozon. Det oxiderende stof er ofte dannet enten direkte eller indirekte ved et kemikalies reaktion med solens uv-lys. Ved reducerede betingelser i omgivelserne kan der forekomme en abiotisk reduktion af det organiske stof. Reducerede betingelser kan eksempelvis forekomme i den anoxiske del af sediment. Et reducerende stof i den forbindelse kan eksempelvis være Fe^{++} . Fotokemisk nedbrydning kan eksempelvis forekomme i den del af vandmiljøet, hvor solens lys og især det ultraviolette lys kan trænge ned. Det er primært halogenerede forbindelser, der omsættes ved fotokemisk nedbrydning. Halogenatomet fjernes fra det organiske molekyle og erstattes med hydrogen [Bjerregaard, 2005].

5 Sorptionskinetik

Ved forekomst af fremmede stoffer i vandmiljø, er det interessant at vide, hvor det vil befinde sig og hvor mobilt eller immobilt, det vil være. Det afhænger af, om det fremmede stof er opløst i vandfasen, eller det sorberes til partikler i sedimentet. Ved opløsning i vandfasen er det fremmede stof overvejende mobilt og vil bevæge sig rundt som følge af strømninger i vandfasen. Ved sorption til sedimentet vil det fremmede stof overvejende være immobilt og bevæge sig når sedimentpartiklerne bevæges.

Under betegnelsen sorption skelnes der mellem adsorption og absorption. Ved adsorption sker bindingen af stoffet til overflader, og ved absorption sker bindingen i selve strukturen af materialet. Der er ingen forskel i denne sammenhæng, om stoffet er absorberet eller adsorberet, derfor benyttes den samlede betegnelse sorption om begge tilfælde [Harremoës *et al.*, 1997], [Loll & Moldrup, 2000]. Sorption af stoffer til partikler sker primært for organiske stoffer på apolær form. Ved apolær form er der en ensartet elektronegativitet over hele det organiske molekyle. Det gør stoffet mere lipofilt (fedtelskende) og hydrofobt (vandhadende). Et mål for polariteten af et stof er dets K_{ow} -værdi. Denne værdi betegnes oktanol/vand fordelingskoefficienten. Et apolært stof har en høj K_{ow} -værdi [Bjerregaard, 2005].

Binding af stoffer til jordpartikler kan også ske ved ionbytning. Ionbytning bygger på den tiltrækningskraft, der er mellem molekyler med positive ladninger og molekyler med negative ladninger. Ionbytning forekommer primært for uorganiske stoffer samt den polære form af organiske stoffer. Organiske stoffer på polær form er sammensat af atomer med forskellig elektronegativitet, dette medfører en uensartet ladning over hele molekylet. Polære stoffer er hydrofile (vandopløselige), da vand også er polært. Polære stoffer har lave K_{ow} -værdier [Bjerregaard, 2005]. Partiklerne i jorden eller i sedimentet er generelt negativt ladede, derfor tiltrækkes de polære organiske stoffer med den positive del af molekylet. Ligeledes tiltrækkes de uorganiske stoffer i form af kationer såsom; H^+ , Al^{3+} , Ca^{2+} , Na^+ med flere [Harremoës *et al.*, 1997], [Loll & Moldrup, 2000].

5.1 Sorption af apolære organiske stoffer

Sorption af apolære organiske stoffer er drevet af hydrofobe vekselvirkninger. Det er især den organiske fraktion i sedimentet, som de apolære stoffer sorberes til. Det skyldes, at organiske stoffer i sedimentet er mindre polære end vandfasen. Det organiske stof har derfor en polaritet, der svarer mere til det apolære stof end vandfasen har. Sedimentet udgør derfor et mere favorabelt miljø for apolære stoffer. De hydrofobe vekselvirkninger er fra et kemisk synspunkt den svageste binding mellem et stof og sorbenten. Der forekommer ikke en egentlig tiltrækning mellem de to komponenter, og der dannes derfor ingen bindingsenergi imellem dem. Graden af

sorption afhænger af en række parametre både fysiske og kemiske. Af fysiske parametre gælder det blandt andet koncentrationen af stoffet samt den omgivende temperatur. Derudover har sedimentet et maksimum for, hvad det har kapacitet til at sorbere. Af kemiske parametre kan der nævnes polariteten af stoffet, pH-værdien i omgivelserne samt sedimenttypen. For sedimenttypen afhænger graden af sorption specielt af indholdet af organisk stof, men også hvilken kornstørrelsesfordeling der er i sedimentet. Hvis der er tale om et meget finkornet sediment, har det en stor overflade, hvilket giver stor kapacitet til at sorbere stoffer. Grovkornet sediment har en mindre overflade og dermed en mindre kapacitet til sorption af stoffer [Løll & Moldrup, 2000].

Der vil sideløbende med sorption af stof forekomme desorption af stof. Efter en periode med sorptions- og desorptionsprocesser kan en ligevægt indstilles mellem fordelingen af stof i sediment- og vandfase [Løll & Moldrup, 2000].

Denne ligevægtsfordeling kan beskrives ved hjælp af empiriske modeller, og der er primært tre, som finder anvendelse. Det drejer sig om; den lineære isotherm, Langmuir isothermen og Freundlich isothermen. Alle tre modeller viser ligevægtsfordelingen i forhold til stoffets koncentration. Ved modellering med disse isothermer er der gjort en række antagelser. Det antages blandt andet, at ligevægten forekommer øjeblikkeligt, der er kun ubetydelig indflydelse fra sorption af andre stoffer, og processen for sorption-desorption er fuldt reversibel [Løll & Moldrup, 2000].

5.1.1 Lineær sorptions-isotherm

Den lineære sorptions-isotherm er den simpleste og mest anvendte blandt isothermerne. Den består af blot en enkelt parameter, fordelingskoefficienten, K_d ;

$$C_s = K_d \cdot C_l \quad (5.1)$$

hvor

C_s = sorberet koncentration [mg kg^{-1}]

K_d = fordelingskoefficienten [L kg^{-1}]

C_l = koncentration i væskefasen [mg L^{-1}]

Den lineære sorptions-isotherm udtrykkes bedst ved lave koncentrationer af stof, hvilket styrker dens anvendelighed, da det er den situation, som oftest ses i miljøet. Fordelingskoefficienten, K_d afhænger af indholdet af organisk stof i sedimentet. Sammenhængen mellem organisk stof og fordelingskoefficienten, K_d kan beskrives således;

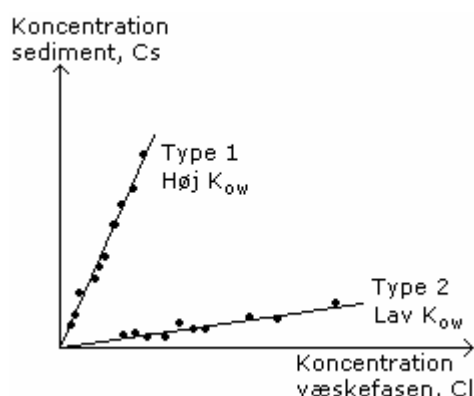
$$K_d = K_{oc} \cdot f_{oc} \quad (5.2)$$

hvor

K_{oc} = fordelingskoefficient mellem organisk kulstof og vand [$\text{L vand (kg oc)}^{-1}$]

f_{oc} = andelen af organisk kulstof [-]

Ovenstående sammenhæng gælder ved de tilfælde, hvor andelen af organisk kulstof, f_{oc} er over 0,001 bestemt ud fra vådvægten. Dette skyldes, at andre mekanismer træder ind ved lavere andele af organisk kulstof. Eksempelvis bliver sorption til sand og ler ikke uden betydning [Harremoës *et al.*, 1997]. Fordelingskoefficienten mellem organisk kulstof og vand, K_{oc} angiver stoffets villighed til at sorbere. Andelen af organisk kulstof, f_{oc} angiver sedimentets villighed til at sorbere [Loll & Moldrup, 2000]. Fordelingskoefficienten mellem organisk kulstof og vand, K_{oc} korrelerer desuden godt med oktanol/vand fordelingskoefficienten, K_{ow} . En høj K_{ow} -værdi indikerer som sagt et apolært stof [Harremoës *et al.*, 1997], [Connell *et al.*, 1999]. Figur 5.1 viser to skitserede eksempler på, hvordan lineær fordeling af stof i sediment og vand kan se ud.



Figur 5.1 Skitse over to typer stof med lineær fordeling imellem væskefase og sediment, efter [Loll & Moldrup, 2000].

Det fremgår af figur 5.1, at den første type stof sorberer bedre til sedimentet end type 2. Det skyldes, at stof type 1 har en højere K_{ow} -værdi og er dermed mere apolært end stof type 2 [Loll & Moldrup, 2000].

5.1.2 Langmuir isoterm

Langmuir isotermen tager hensyn til, at der kan forekomme en begrænsning i, hvor meget stof sedimentet kan sorbere. Det antages, at sedimentet kun har et vist antal sorptionspladser, som er fordelt over et lag og med samme affinitet. Langmuir isotermen indeholder to parametre;

$$C_s = C_{s, \max} \cdot \frac{K_L \cdot C_l}{1 + K_L \cdot C_l} \quad (5.3)$$

hvor

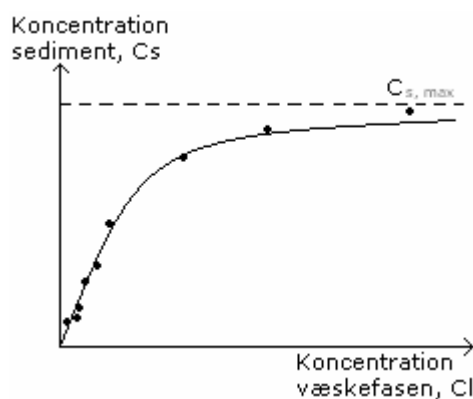
C_s = sorberet koncentration [mg kg^{-1}]

$C_{s, \max}$ = maksimal sorptionskapacitet [mg kg^{-1}]

K_L = Langmuir fordelingskoefficient [L kg^{-1}]

C_l = koncentration i væskefasen [mg L^{-1}]

Idet Langmuir isotermer tager højde for en maksimal sorptionskapacitet betyder det, at når den sorberede koncentration er lig med den maksimale sorptionskapacitet, $C_s = C_{s, \max}$, så vil en yderligere mængde af stof i væskefasen ikke medføre en øget sorption til sedimentet. Det skal bemærkes, at Langmuir isotermer ikke altid er velegnet ved sorptionskinetik for organiske apolære stoffer. Det skyldes, at der ofte ikke kan defineres en maksimal sorptionskapacitet som følge af antal sorptionspladser i sedimentet, da apolære stoffer i naturen ikke kun sorberes i et lag [Loll & Moldrup, 2000]. Figur 5.2 viser en skitsering af fordelingen af stof mellem sediment og væskefase ud fra en Langmuir isoterm.



Figur 5.2 Skitse af stoffordelingen mellem sediment og væskefase ud fra Langmuir isotermer, efter [Loll & Moldrup, 2000].

5.1.3 Freundlich isoterm

Freundlich isotermer har ikke som Langmuir isotermer en parameter for maksimal sorptionskapacitet. Den er ikke-lineær i hele sit forløb og udtrykkes således;

$$C_s = K_F \cdot C_l^n \quad (5.4)$$

hvor

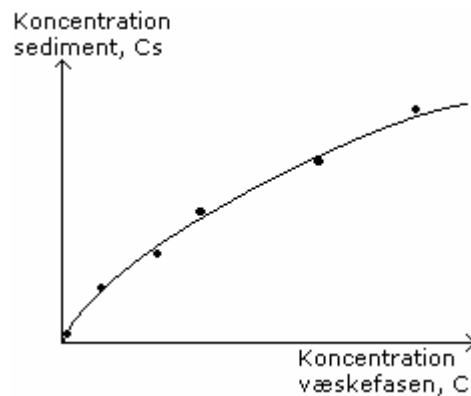
C_s = sorberet koncentration [mg kg^{-1}]

K_F = Freundlich fordelingskoefficient [L kg^{-1}]

C_l = koncentration i væskefasen [mg L^{-1}]

n = empirisk parameter [-]

Den empiriske parameter, n antager en værdi mellem 0 og 1. Freundlich isotermer er den mest anvendte ikke-lineære sorptionsisoterm [Loll & Moldrup, 2000]. Figur 5.3 viser en skitsering af fordelingen af stof mellem sediment og væskefase ud fra en Freundlich isoterm.



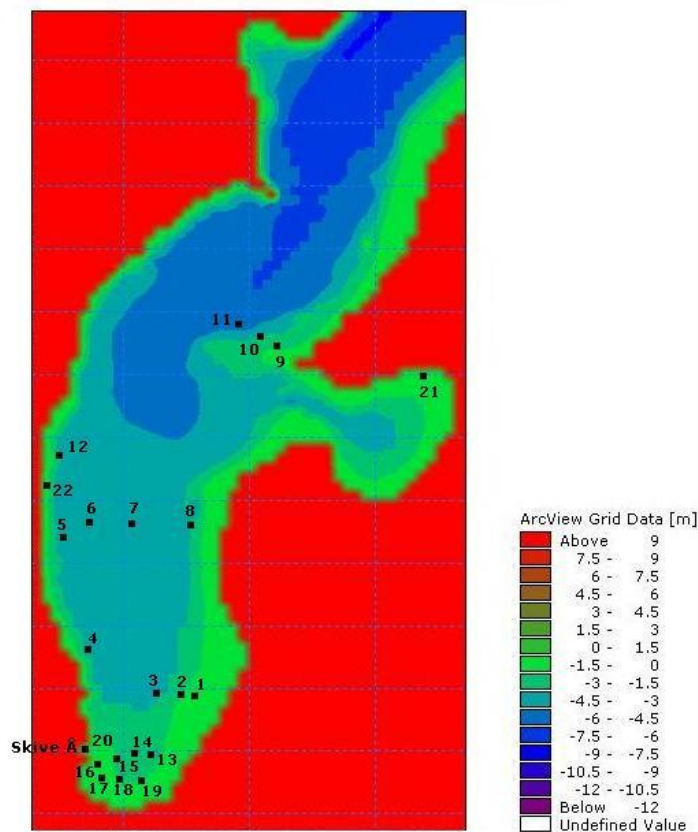
Figur 5.3 Skitse af stoffordelingen mellem sediment og væskefase ud fra Freundlich isothermen, efter [Loll & Moldrup, 2000].

Ved valg af sorptions-isoterm er det vigtigt, at isothermen giver en god beskrivelse i netop det koncentrationsinterval, som er relevant for målingerne. Det betyder, at de mekanismer, som udgør sorptionsprocessen, er mindre vigtige i forhold til modellens evne til at fitte det aktuelle data. Ved anvendelse af isotermer fra litteraturen er det også her vigtigt at bemærke, hvilket interval modellen dækker og kun anvende det relevante interval. Koncentrationen af stoffet i naturen er ofte meget lavere end de koncentrationer, som anvendes ved forsøg i laboratoriet [Loll & Moldrup, 2000].

De nævnte isotermer kan også til en vis grad anvendes ved beskrivelse af desorptionsprocesser. Data for desorption er ikke så udbredt i litteraturen, og derfor er det almindelig praksis at antage, at isotermerne for sorption og desorption er de samme [Loll & Moldrup, 2000].

6 Metoder

Sedimentprøverne til forsøgene er udtaget fra 22 prøvestationer i Skive Fjord. Prøvestationerne er vist på figur 6.1. Ved de enkelte forsøg indgår et udvalg af prøvestationerne.



Figur 6.1 Skive Fjord vist med dybdekurver samt placering af prøvestationer.

Sedimentprøverne er udtaget med en prøvetager bestående af et plexiglasrør, der bores ned i sedimentet. Herved optages en sedimentsøjle med en diameter på 5,3 cm og med en længde på ca. 30 cm. Fra sedimentsøjlen udtages fra dybden 0-2 cm en skive af sediment til brug ved forsøgene. Ved forsøg, hvor der anvendes større mængder af sediment, er prøverne udtaget med sediment-skovl i dybderne 0-2 cm og 2-4 cm. Prøverne er opbevaret mørkt og på køl ved max. 5° C.

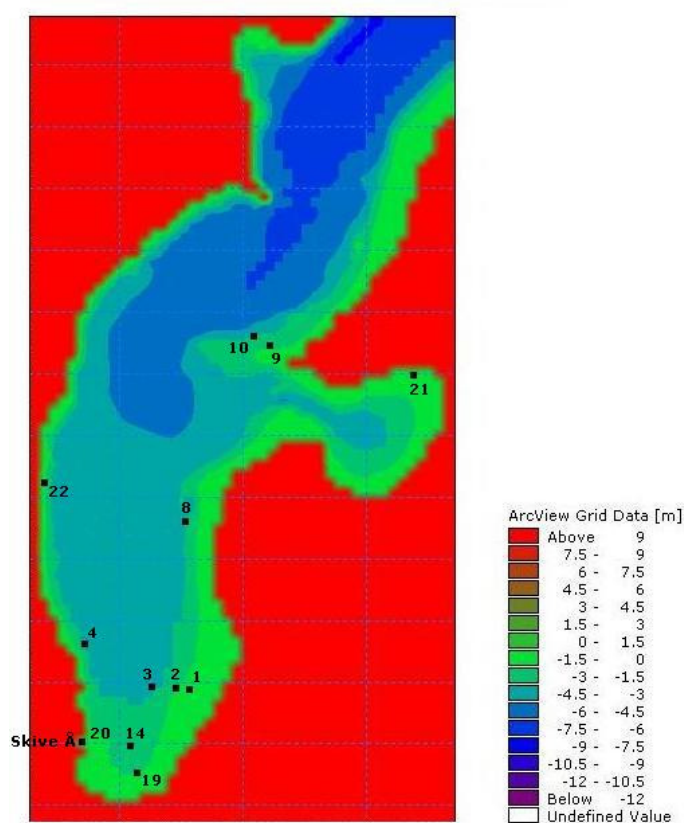
Der er udført følgende forsøg til karakterisering af østrogens skæbne i recipienten Skive Fjord;

- Bestemmelse af østrogenindhold i sediment fra Skive Fjord
- Bestemmelse af tørstof og glødetab
- Forsøg med nedbrydning af østrogenet EE2

- Forsøg med sorption af østrogenet EE2
- Bestemmelse af kornstørrelsesfordeling

6.1 Bestemmelse af østrogenindhold i sediment fra Skive Fjord

Indholdet af østrogenene E1, E2 og EE2 i sediment fra Skive Fjord bestemmes ved 12 prøvestationer. Prøvestationerne er markeret på figur 6.2.



Figur 6.2 Placering af prøvestationer i Skive Fjord, hvor indholdet af østrogen i sedimentet er bestemt.

Der udtages en prøvemængde for hver prøvestation svarende til ca. 75 g tørret sediment, hvilket betyder at for hver prøvestation udtages fire sedimentsøjler, og den samlede prøvemængde puljes sammen. Prøverne opbevares i fryseposer og nedkøles, således at den biologiske aktivitet standses. Ved hjemkomst sættes prøverne til tørring i varmeovn ved 60° C. Når prøverne er helt tørre ekstraheres de med ethylacetat. Ekstraktet fra prøverne er uklart, og det filtreres igennem

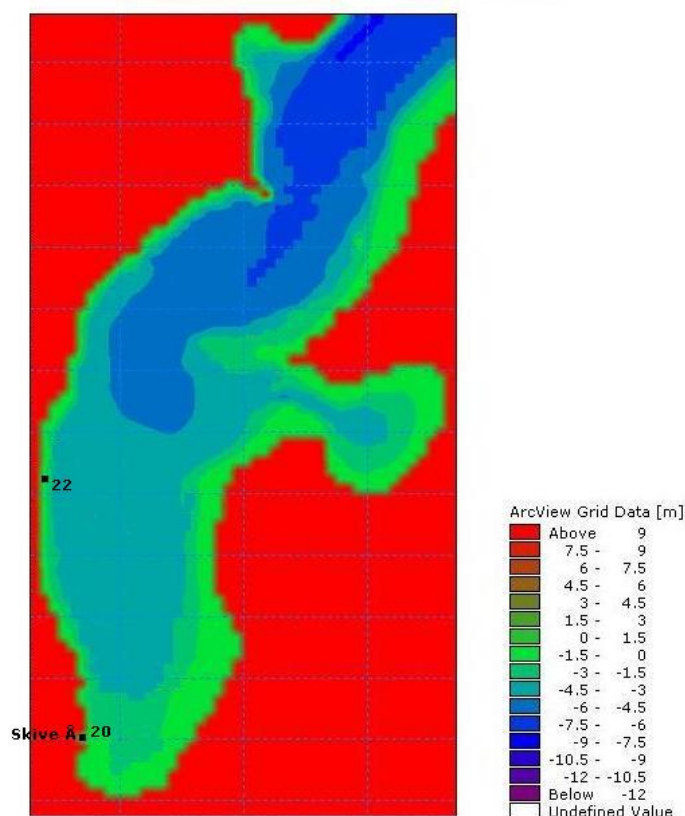
en C18 kolonne. Afslutningsvis derivatiseres prøverne under låg med MSTFA ved 60° C i 60 minutter. Bestemmelsen af østrogenene foretages på GC-MS, for nærmere oplysning omkring dette, se Appendiks B *Gas Kromatografi*. For yderligere oplysninger omkring forsøgsbetingelserne, se bilag 2 *Ekstraktion af østrogener*.

6.1.1 Bestemmelse af tørstof og glødetab

Der bestemmes tørstof og glødetab ved alle prøvestationer i Skive Fjord, der er vist på figur 6.1. Glødetabet i en sedimentprøve indikerer mængden af organisk stof. Det er således muligt at skabe et billede af fordelingen af organisk stof i Skive Fjord. Ved bestemmelsen af tørstof afvejes 4 ml vådt sediment, hermed kan densiteten af sedimentet også bestemmes. Det våde sediment tørres ved 105° C i minimum 22 timer og afvejes igen. Ved bestemmelse af glødetab anbringes det tørrede sediment i en glødeovn ved 550 ° C i minimum 2 timer, herefter vejes det igen. Bestemmelsen af tørstof og glødetab er foretaget ud fra Dansk Standard 204, for nærmere oplysning se bilag 3 *Bestemmelse af tørstof og glødetab*.

6.2 Forsøg med nedbrydning af østrogenet EE2

Det undersøges, hvordan bakterier i sediment nedbryder østrogenet EE2. Sedimentet er udtaget ved to prøvestationer i Skive Fjord. Den første prøvestation er i turbiditetszonen ved udløbet af Skive Å, hvorfra det rensede spildevand fra Skive Renseanlæg ledes ud i fjorden. Den anden prøvestation er nummer 22, hvor det antages, at der ingen påvirkning forekommer fra Skive Å. Prøvestation nummer 22 ligger ved vestkysten ca. 4 km nord for udløbet af Skive Å. Prøvestationerne kan ses af figur 6.3.



Figur 6.3 Placering af prøvestationer i Skive Fjord, hvorfra sediment til nedbrydning af østroget EE2 er udtaget.

Nedbrydning af østrogen undersøges i en blanding af sediment og fjordvand. Nedbrydningen udføres både under aerobe og anaerobe forhold. Til de aerobe forsøg benyttes sediment fra 0-2 cm dybde, til de anaerobe forsøg benyttes sediment udtaget i 2-4 cm dybde. Der tilsættes koncentrationer af EE2 på henholdsvis; 500 ng/ml, 1000 ng/ml og 2000 ng/ml. Desuden udføres et kontrolforsøg, hvor sediment og fjordvand er autoklaveret inden tilsætning af EE2.

Et forsøg består af en række af batchforsøg i serumflasker, hvortil den aktuelle koncentration af EE2 tilsættes. Med passende interval eksempelvis dag 0, 3, 5, 7 og 11 udtages en prøve, således at nedbrydningen af østroget følges, indtil det helt eller delvist er nedbrudt af biomassen. Efter denne periode er halvdelen af prøverne udtaget og de resterende tilsættes på ny den aktuelle koncentration af EE2. Der udtages igen prøver efter samme princip med passende interval. Dette gøres for at følge nedbrydningen af EE2 både før og efter en periode, hvor biomassen har været eksponeret for østroget. Prøverne inkuberes på rystebord ved 200 rpm og 20° C. Der holdes mørkt omkring forsøgene for at undgå fotosyntese fra alger og mikroorganismer.

Nedbrydningen i prøverne standses ved at tørre dem i varmeovn ved 60° C, efterfølgende ekstraheres de efter samme princip som ved bestemmelse af østrogenindhold i Skive Fjord. For

yderligere oplysninger se bilag 4 *Nedbrydning af østrogen*. Bestemmelse af koncentrationen af EE2 foretages på Gas Kromatograf, for nærmere oplysninger, se Appendiks A *Gas Kromatografi*. Ved sammenholdelse af tid og den resterende koncentration af østrogen i prøverne kan nedbrydningsratekonstanten, K beregnes, og bakteriernes nedbrydningskinetik overfor EE2 kan bestemmes.

6.3 Forsøg med sorption af østrogenet EE2

Sorption af EE2 til sediment fra Skive Fjord bestemmes ud fra tre forsøg ved at undersøge:

1. Tilsætning af forskellige koncentrationer EE2 til sedimentet.
2. Tilsætning af EE2 til sediment med forskellige indhold af organisk stof.
3. Anvendelse af væskefaser med forskellig salinitet, i dette tilfælde Å-, hav- eller fjordvand.

Alt sediment til forsøgene er udtaget i Skive Fjord i en dybde på 0-2 cm. Havvandet er udtaget i Vesterhavet, å-vandet er udtaget i Skive Å og fjordvandet er fra Skive Fjord. Sediment og vandfase autoklaveres inden forsøgsstart, så det sikres at al biologisk aktivitet stoppes. Med sediment og vandfase i engangscentrifugeflasker tilsættes den aktuelle koncentration af EE2. Flaskerne sættes på rystebord i minimum 16 timer, således at en ligevægt kan indstille sig. Herefter centrifugeres flaskerne, så det er muligt at skille væskefasen fra sedimentet, og indholdet af østrogen i begge faser bestemmes. For yderligere oplysninger se bilag 5 *Sorption af østrogen*. Bestemmelse af koncentrationen af EE2 foretages på Gas Kromatograf, for nærmere oplysninger, se Appendiks A *Gas Kromatografi*.

Ved forsøg 1 tilsættes EE2 i koncentrationer på henholdsvis 400, 600, 800, 1000 og 1500 ng/ml. Ved forsøg 2 er sedimentet udtaget ved tre stationer i Skive Fjord for at opnå det varierende indhold af organisk stof. Sedimentet indeholder dermed henholdsvis 0,69 %; 3,2 % og 4,9 % organisk stof bestemt ud fra tørvægt, dw. Sedimentet er udtaget ved station nummer 1, 4 og 19, se figur 6.1. Ved forsøg 3 opløses sedimentet i enten å-, fjord- eller havvand. Saliniteten måles for de tre vandfaser.

6.3.1 Bestemmelse af kornstørrelsesfordeling

Ved sorptionsforsøg 2 undersøges graden af sorption ved forskellige indhold af organisk stof i sedimentet. Graden af sorption kan imidlertid også afhænge af kornstørrelsesfordelingen i sedimentet. Derfor bestemmes kornstørrelsesfordeling og densitet af det tørre sediment for de tre sedimenttyper. Sedimentprøverne tørres og sies gennem fem sier med maskestørrelserne 2,5 mm, 630 µm, 500 µm, 250 µm og 125 µm. Dermed kan den kumulerede kornstørrelsesfordeling bestemmes. Densiteten af det tørre sediment findes ved at bestemme vægten af en mængde

sediment med en kendt volumen. For yderligere oplysninger se bilag 6 *Bestemmelse af kornstørrelsesfordeling og densitet*.

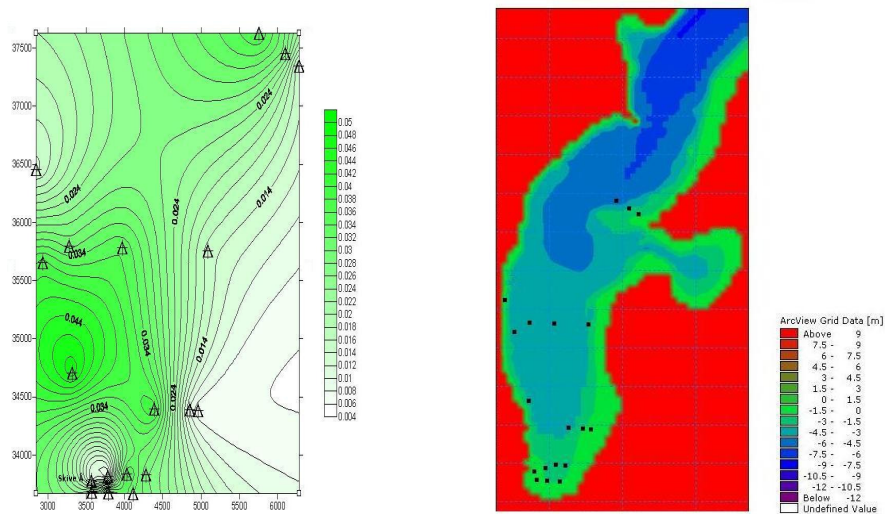
7 Resultater

Ved databehandling af måleresultater fra gas kromatograf er der udført kontrol ved bestemmelse af relativ retentionstid. Der er desuden foretaget en kvalitetskontrol af standarddrækker, se Appendiks B *Kvalitetskontrol af målinger på GC*. Rådata og beregninger for standarddrækkerne kan ses af bilag 12 *Standarder*.

7.1 Bestemmelse af østrogenener i Skive Fjord

Ved bestemmelse af E1, E2 og EE2 i Skive Fjord på GC-MS blev ingen af østrogenenerne observeret.

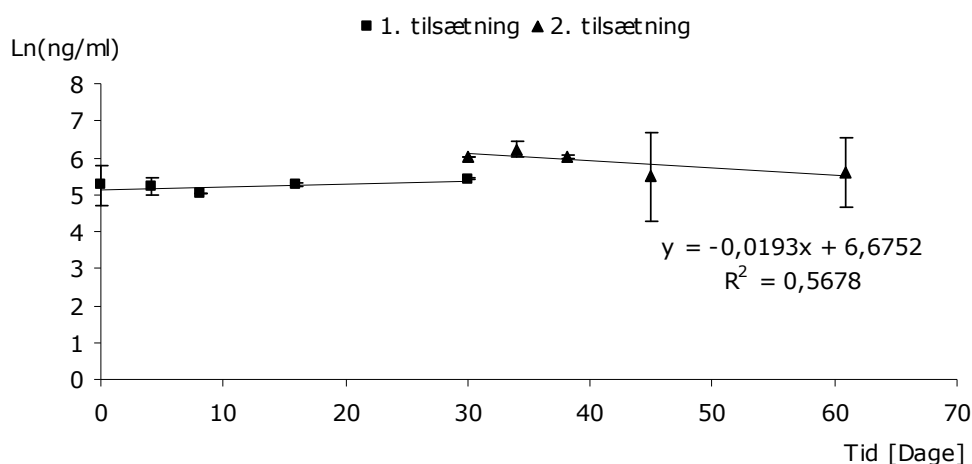
Fordeling af organisk indhold i sedimentet 0-2 cm i Skive Fjord fremgår af venstre del af figur 7.1. Højre del af figuren viser placeringen af målestationerne i Skive Fjord, målestationerne er markeret som trekanter på venstre del af figur 7.1. Rådata og beregninger fremgår af bilag 11 *Gløde og tørstofbestemmelse*.



Figur 7.1 Til venstre, fordeling af organisk stof i sedimentet 0-2 cm i Skive Fjord. Til højre, placering af målestationer til bestemmelsen af organisk stof i sedimentet. Målestationerne er markeret som trekanter på venstre del af figuren.

7.2 Nedbrydning af EE2

Ved sammenligning af den r-kvadrerede værdi, R^2 er det bestemt, hvorvidt der er tale om 0. eller 1. orden nedbrydning ud fra et regulært eller semi-logaritmisk plot af dataet. Figur 7.2 viser et eksempel med sediment fra Skive Å, som ingen nedbrydning har efter 1. tilsætning, efter 2. tilsætning ses en 1. orden nedbrydning. Forsøget er udført under anaerobe forhold, og startkoncentrationen af EE2 er 205,8 ng/ml ved 1. tilsætning og 506,3 ng/ml ved 2. tilsætning. Rådata og beregninger kan ses i bilag 9 *Nedbrydningsforsøg Skive Å* på cd-rom.



Figur 7.2 Skive Å, anaerobe forhold, startkoncentration 205,8 ng/ml EE2 ved 1. tilsætning og 506,3 ng/ml ved 2. tilsætning, ingen nedbrydning ved 1. tilsætning, 1. orden nedbrydning ved 2. tilsætning.

Forsøg med sediment fra Skive Å under anaerobe forhold giver en nedbrydningsratekonstant, K på $0,0193 \text{ h}^{-1}$ ved 2. tilsætning af EE2, se figur 7.2.

Ud fra nedbrydningsratekonstanten, K er halveringstiden, $T_{1/2}$ beregnet for EE2 ud fra ligning 4.8. Halveringstiden, $T_{1/2}$ for eksemplet fra figur 7.2 beregnes således;

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{0,0193} \approx 36 \text{ dage}$$

Resultater, for nedbrydningsforsøg udført med sediment fra Skive Å under aerobe forhold, fremgår af tabel 7.1. Mængden af EE2 [ng/ml] angivet i tabellen er koncentrationniveauet ved forsøgsstart. Resultaterne er nævnt i rækkefølge efter de reelt tilsatte mængder på henholdsvis 500 ng/ml, 1000 ng/ml og 2000 ng/ml. Rådata og beregninger kan ses i bilag 9 *Nedbrydningsforsøg Skive Å* på cd-rom.

Tabel 7.1 Skive Å, aerobe forhold

1. tilsætning					2. tilsætning				
EE2 [ng/ml]	K [h ⁻¹]	T _½	R ²	kinetik	EE2 [ng/ml]	K [h ⁻¹]	T _½	R ²	kinetik
55,9	0,0002	3466	0,1496	1. orden	56,5	IN	IN	-	IN
19,6	IN	IN	-	IN	29,2	IN	IN	-	IN
26,5	0,0019	365	0,9616	1. orden	35,9	0,0131	53	0,4916	0. orden

K = nedbrydningsratekonstant

IN = Ingen Nedbrydning

Resultater, for nedbrydningsforsøg udført med sediment fra Skive Å under anaerobe forhold, fremgår af tabel 7.2. Rådata og beregninger kan ses i bilag 9 *Nedbrydningsforsøg Skive Å* på cd-rom.

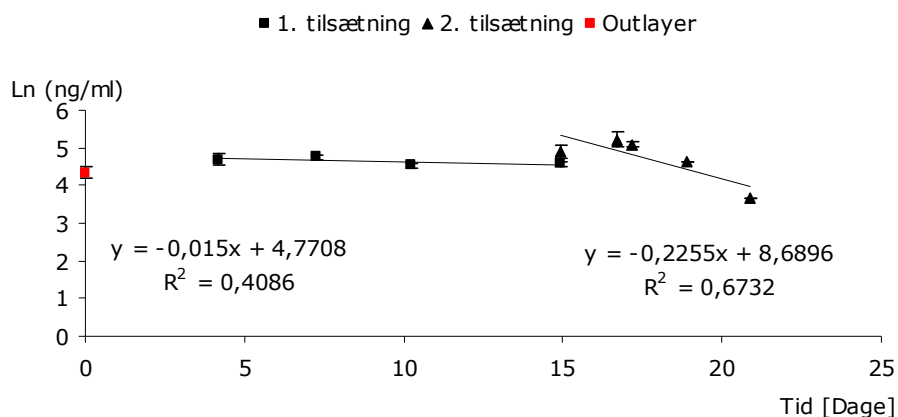
Tabel 7.2 Skive Å, anaerobe forhold

1. tilsætning					2. tilsætning				
EE2 [ng/ml]	K [h ⁻¹]	T _½	R ²	kinetik	EE2 [ng/ml]	K [h ⁻¹]	T _½	R ²	kinetik
941,2	0,0085	82	0,9067	1. orden	81,5	0,0006	1155	0,0363	1. orden
205,8	IN	IN	-	IN	506,3	0,0193	36	0,5678	1. orden
983,3	2,1231	0,3	0,5924	0. orden	89,5	IN	IN	-	IN

K = nedbrydningsratekonstant

IN = Ingen Nedbrydning

Et eksempel på nedbrydning under anaerobe forhold med sediment fra den upåvirkede prøvestation fremgår af figur 7.3. Forsøget viste, at både 1. – og 2. tilsætning af EE2 gav 1. orden nedbrydning. Startkoncentrationen af EE2 er på 117,1 ng/ml ved 1. tilsætning og 187,0 ng/ml ved 2. tilsætning. Rådata og beregninger kan ses i bilag 10 *Nedbrydningsforsøg Upåvirket* på cd-rom.



Figur 7.3 Upåvirket, anaerobe forhold, startkoncentration EE2 117,1 ng/ml ved 1. tilsætning og 187,0 ng/ml ved 2. tilsætning, 1. orden nedbrydning ved 1. – og 2. tilsætning.

Nedbrydningsratekonstanten, K ligger på henholdsvis $0,015 \text{ h}^{-1}$ og $0,2255 \text{ h}^{-1}$ for 1. – og 2. tilsætning af EE2, jf. figur 7.3.

Resultaterne, for aerobe nedbrydningsforsøg udført med sediment fra den upåvirkede prøvestation, fremgår af tabel 7.3. Rådata og beregninger kan ses i bilag 10 *Nedbrydningsforsøg Upåvirket* på cd-rom.

Tabel 7.3 Upåvirket, aerobe forhold

1. tilsætning					2. tilsætning				
EE2 [ng/ml]	$K \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$T_{1/2}$	R^2	kinetik	EE2 [ng/ml]	$K \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$T_{1/2}$	R^2	kinetik
1015,0	0,2004	3	0,5731	1. orden	586,1	1,9056	0,4	0,734	0. orden
676,4	IN	IN	-	IN	788,0	0,0113	61	0,8643	1. orden
793,3	0,0153	45	0,5115	1. orden	596,5	0,0085	81	0,4788	1. orden

K = nedbrydningsratekonstant

IN = Ingen Nedbrydning

Resultaterne for anaerobe nedbrydningsforsøg udført med sediment fra den upåvirkede prøvestation, fremgår af tabel 7.4 Rådata og beregninger kan ses i bilag 10 *Nedbrydningsforsøg Upåvirket* på cd-rom.

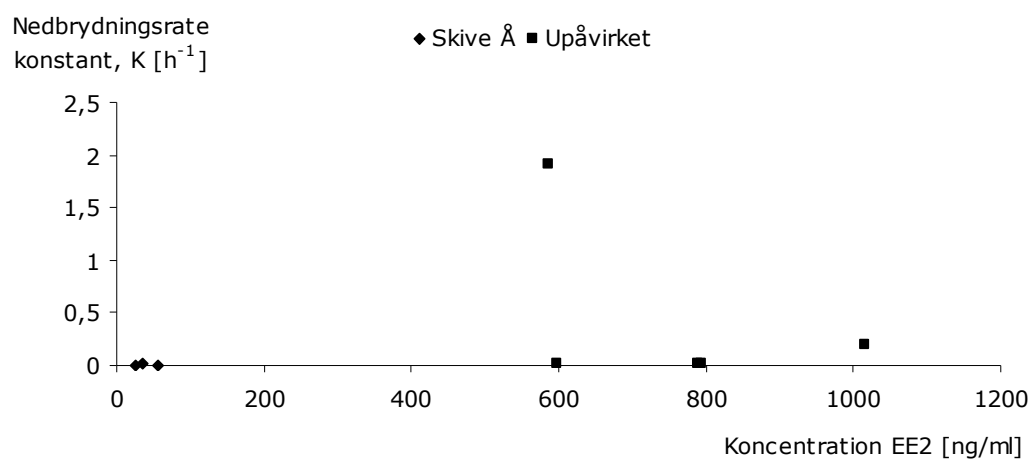
Tabel 7.4 Upåvirket, anaerobe forhold

1. tilsætning					2. tilsætning				
EE2 [ng/ml]	K [h ⁻¹]	T _{1/2}	R ²	kinetik	EE2 [ng/ml]	K [h ⁻¹]	T _{1/2}	R ²	kinetik
117,1	0,015	46	0,4086	1. orden	187,0	0,2255	3	0,6732	1. orden
182,1	0,0984	7	0,2703	0. orden	308,5	0,8901	0,8	0,7177	0. orden
110	IN	IN	-	IN	324,3	0,2713	3	0,1223	0. orden

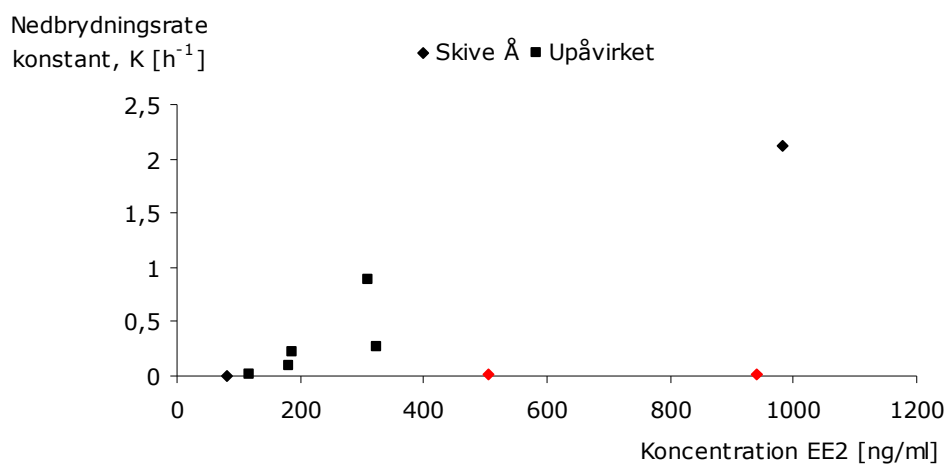
K = nedbrydningsratekonstant

IN = Ingen Nedbrydning

EE2 startkoncentrationen [ng/ml] plottet mod nedbrydningsratekonstanten, K for de aerobe forsøg fremgår af figur 7.4.

**Figur 7.4** EE2 startkoncentration plottet mod nedbrydningsratekonstanten, K for aerobe forsøg.

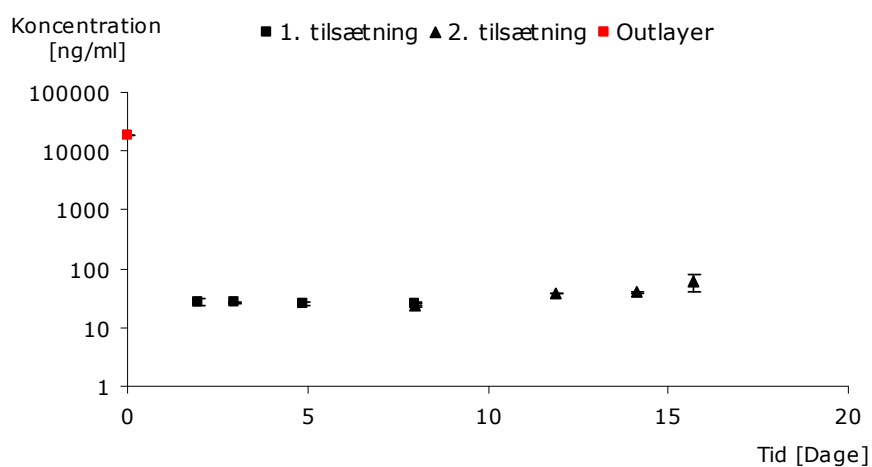
For de anaerobe forsøg viser figur 7.5 EE2 startkoncentrationen [ng/ml] plottet mod nedbrydningsratekonstanten, K.



Figur 7.5 EE2 startkoncentration plottet mod nedbrydningsratekonstanten, K for anaerobe forsøg. Målepunkter markeret med rød er outlayere.

Kontrollforsøg

Med sediment fra Skive Å blev der udført et kontrollforsøg for abiotisk omsætning. Resultatet fremgår af figur 7.6. Rådata og beregninger kan ses i bilag 9 *Nedbrydningsforsøg Skive Å* på cd-rom.

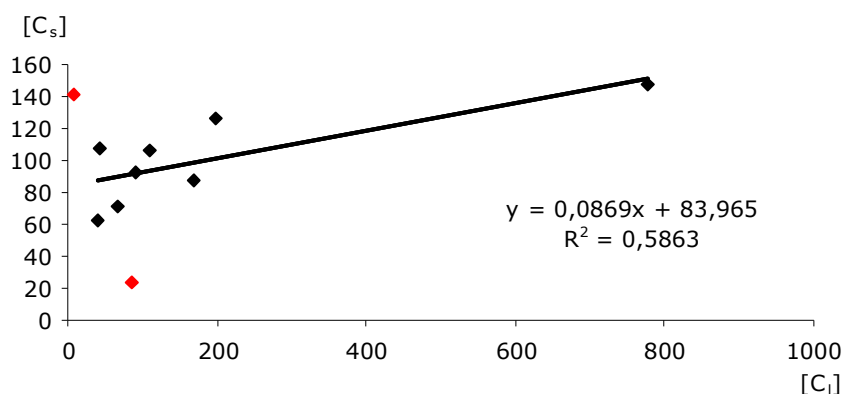


Figur 7.6 Kontrollforsøg for abiotisk nedbrydning. Målepunktet markeret med rød er outlayer.

7.3 Sorption af EE2

Forsøg 1

EE2 blev tilsat i koncentrationer fra 400 - 1500 ng/ml. Dataet fittes til lineær, Langmuir og Freundlich isotermerne for at bestemme hvilken, der beskriver dataet bedst. Den lineære isoterm fittes direkte ved lineær regression til det målte data, se figur 7.7. Beregninger og rådata findes i bilag 7 *Sorptionsforsøg* på cd-rom.



Figur 7.7 Lineær isoterm fittet til målt data. Målepunkter markeret med rød betragtes som outlayere og er ikke medregnet i den lineære regression.

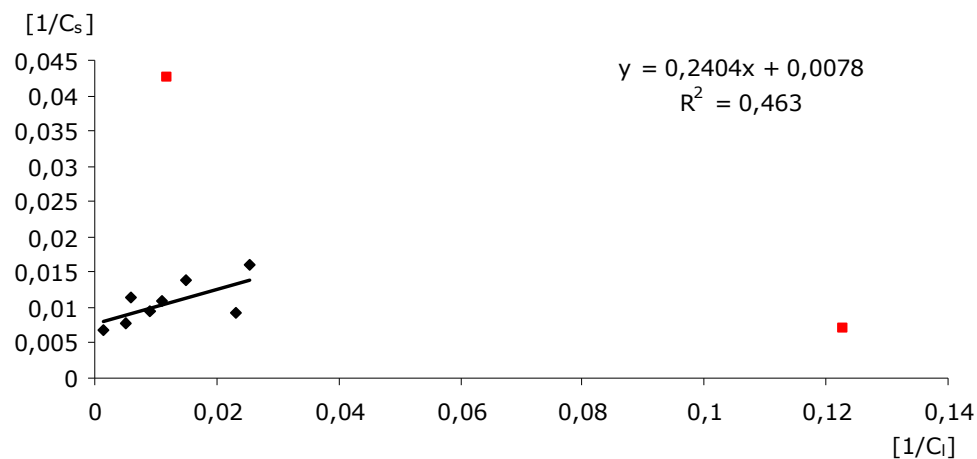
Ligningen for den lineære regression og den r-kvadrerede værdi, R^2 er vist på figur 7.7.

Langmuir isotermerne fittes ved lineær regression ved at tage den inverse værdi af dataet.

Ligningen for Langmuir isotermerne ser da således ud;

$$\frac{1}{C_s} = \frac{1}{C_{s,max} \cdot K_L} \cdot \frac{1}{C_i} + \frac{1}{C_{s,max}} \quad (7.1)$$

Figur 7.8 viser plottet af $1/C_s$ mod $1/C_i$. Beregninger og rådata findes i bilag 7 *Sorptionsforsøg* på cd-rom.

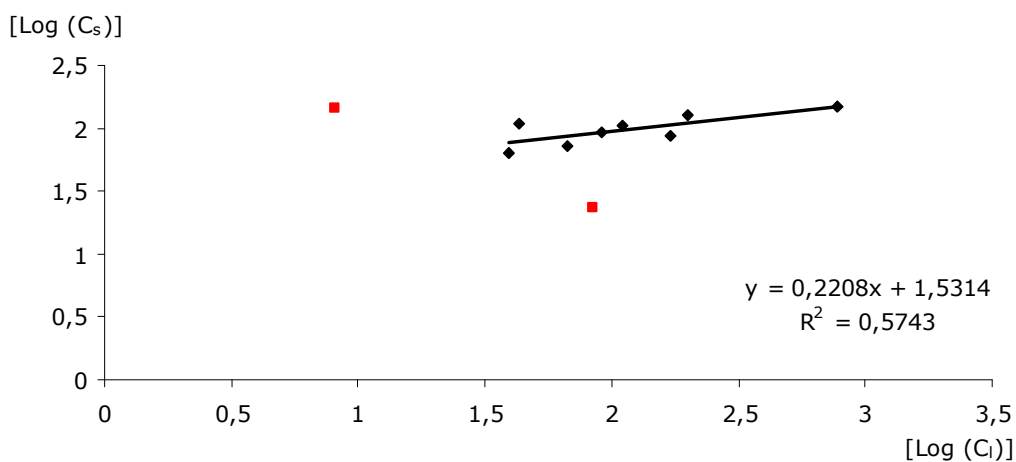


Figur 7.8 Data fittet til Langmuir isotermer efter linearisering. Målepunkter markeret med rød betragtes som outlayere og er ikke medregnet i den lineære regression.

Freundlich isotermerne fittes ved lineær regression ved at tage logaritmen til dataet. Ligningen for Freundlich isotermerne ser da således ud;

$$\log(C_s) = n \cdot \log(C_i) + \log(K_f) \quad (7.2)$$

Figur 7.9 viser plottet af $\log(C_s)$ mod $\log(C_i)$. Beregninger og rådata findes i bilag 7 *Sorptionsforsøg* på cd-rom.



Figur 7.9 Data fittet til Freundlich isotermer efter linearisering. Målepunkter markeret med rød betragtes som outlayere og er ikke medregnet i den lineære regression.

Den r-kvadrerede værdi, R^2 sammenlignes for de tre sorptions isotermer for at bestemme, hvilken der fitter dataet bedst, se tabel 7.5.

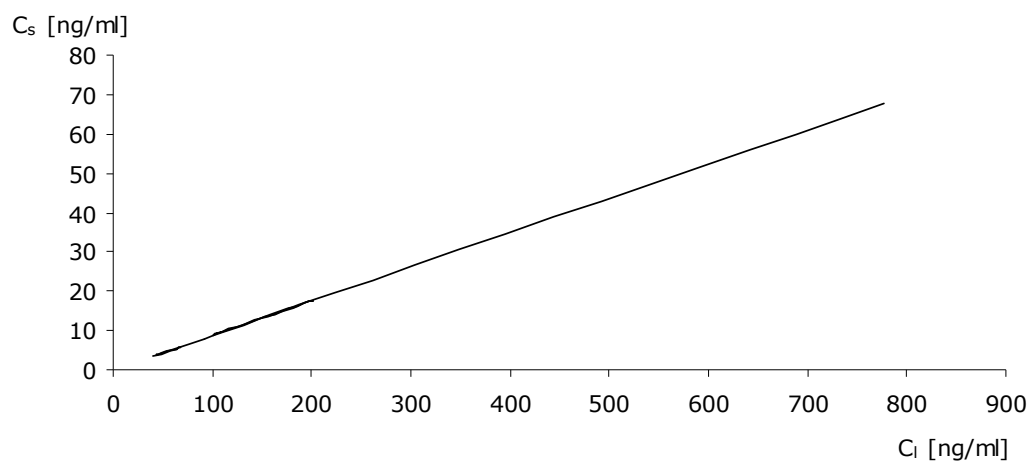
Tabel 7.5 Sammenligning af r-kvadrerede værdier, R^2 for Lineær, Langmuir og Freundlich sorptions-isoterm.

Isoterm	R^2 -værdi
Lineær	0,5863
Langmuir	0,4630
Freundlich	0,5743

Den lineære isoterm udgør det bedst fit af det målte data, jf. tabel 7.5. Ud fra ligningen for den lineære regression vist i figur 7.7 er K_d er lig med 0,0869. Den lineære isoterm for det målte data ser således ud;

$$C_s = 0,0869 \cdot C_i \quad (7.3)$$

Figur 7.10 viser plot af den lineære isoterm i forhold til ligning (7.3). Det målte data for C_i er anvendt som input. Se beregninger i bilag 7 *Sorptionsforsøg* på cd-rom.



Figur 7.10 Plot af den lineære isoterm ifølge ligning 7.3.

Kontrollforsøg

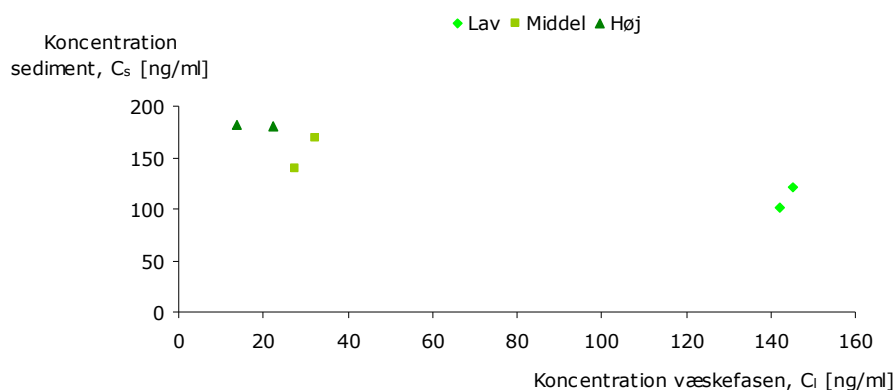
Resultater for genfindingsgraden, %REC ved kontrollforsøget fremgår af tabel 7.6. Rådata og beregninger kan ses i bilag 7 *Sorptionsforsøg* på cd-rom. Beregning af genfindingsgraden, %REC gennemgås i Appendiks B *Kvalitetskontrol af prøver*.

Tabel 7.6

Koncentration, forventet	Koncentration, observeret	Genfindingsgrad, %REC
400	47,5	11,9
400	7,3	1,8
600	136,8	22,8
600	9,7	1,6
800	222,4	27,8
800	10,8	1,3
1000	212,4	21,2
1000	182,1	18,2
1500	177,2	11,8
1500	145,8	9,7

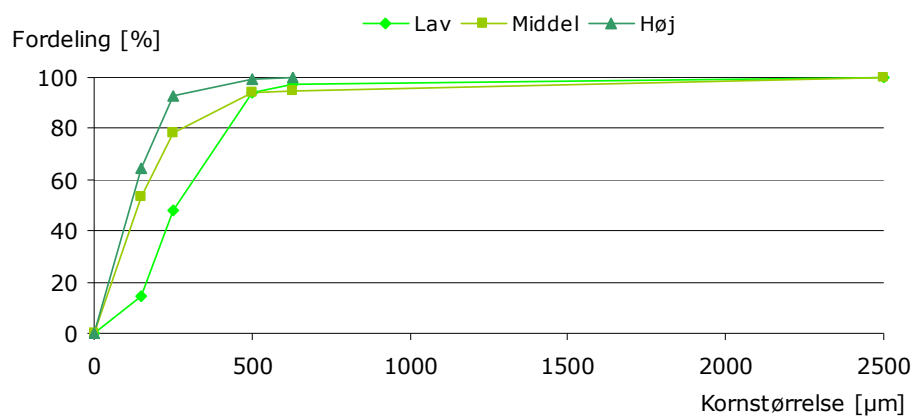
Forsøg 2

Sedimentet indeholdende 0,69 % dw organisk stof betegnes lavt indhold. Sedimentet indeholdende 3,2 % dw organisk stof betegnes middel indhold, og 4,9 % dw organisk stof i sedimentet betegnes højt indhold. Figur 7.11 viser sorptionskinetikken for EE2 i forhold til indholdet af organisk stof i sedimentet. Rådata og beregninger kan ses i bilag 7 *Sorptionsforsøg* på cd-rom.



Figur 7.11 Sorptionskinetik for EE2 i forhold til sediment med lav, middel eller høj koncentration af organisk stof.

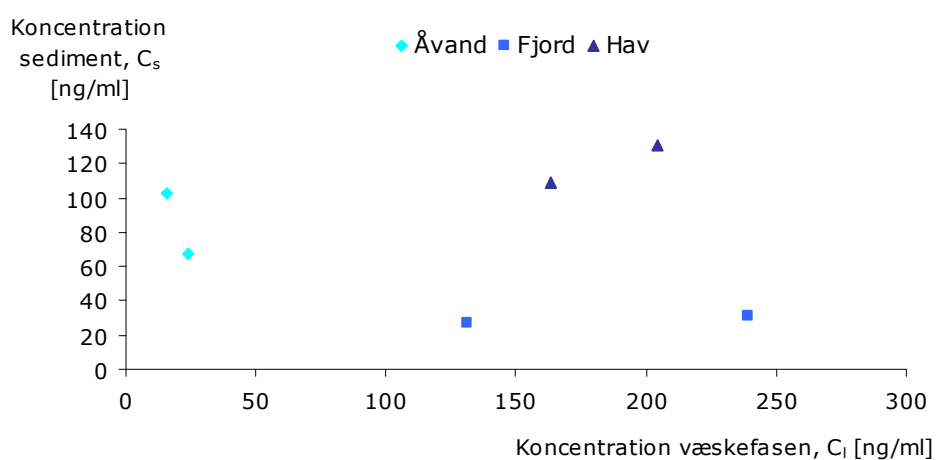
Kornstørrelsesfordelingen er bestemt på de tre typer sediment i forsøg 2. Figur 7.12 viser den kumulerede fordeling af kornkurven. Rådata og beregninger kan ses i bilag 8 *Kornstørrelsesfordeling* på cd-rom.



Figur 7.12 Kornstørrelsesfordeling i sediment med lav, middel eller høj koncentration af organisk stof.

Forsøg 3

Ved forsøg 3 anvendes væskefaser med forskellig salinitet, i dette tilfælde Å-, hav- eller fjordvand. Saliniteten blev i vand fra Skive Å målt til 0,34 ‰, fra Skive Fjord til 25,94 ‰ og fra Vesterhavet til 33,42 ‰. Figur 7.13 viser, hvordan EE2 fordeler sig i væske- og sedimentfasen ved henholdsvis Åvand, vand fra fjorden eller havvand.



Figur 7.13 Fordeling af EE2 mellem væske- og sedimentfase i forhold til en væskefase fra henholdsvis Å, fjord eller hav.

8 Diskussion

8.1 Fordeling af organisk stof i Skive Fjord

De højeste koncentrationer af organisk stof i sedimentet i Skive Fjord forekommer som forventet langs vestkysten af den nederste del af Fjorden. Det var forventet, da området udgør den dybeste del fjorden, hvor prøverne er blevet udtaget. Ved dybere vandområder forekommer der mindre resuspension, det vil sige, det organiske stof i disse områder sedimenteres og flyttes ikke med strømninger rundt i fjorden. Langs østkysten i den nederste del af fjorden blev de laveste koncentrationer af organisk stof som forventet fundet. Det var forventet, da området her var det mest lavvandede i forhold til de områder, hvor prøverne blev udtaget. Ved lavvandede områder forekommer meget resuspension og de letteste partikler, herunder organisk stof hvirvles op og flyttes med strømninger til andre dele af fjorden. Ved områder med mindre resuspension sedimenteres partiklerne.

Forsøg udført af Thulsted & Uhre, 2005 med sediment 0-2 cm fra Skive Fjord viste koncentrationer af E1, E2 og EE2 ved en målestation ud for vestkysten ca. 3 km nord for udmundingen af Skive Å. Dette er et område med høje koncentrationer af organisk stof, jf. figur 7.1 og bekræfter dermed forventningen om, at østrogenene akkumuleres i områder med høje koncentrationer af organisk stof. Thulsted & Uhre, 2005 fandt desuden EE2 ved to andre målestationer også placeret i områder med høje koncentrationer af organisk stof i sedimentet.

8.2 Diskussion af nedbrydningsforsøg

Ved nedbrydning i sediment fra Skive Å under aerobe forhold ses det, at en startkoncentration af EE2 på 26,5 ng/ml giver nedbrydning ved 1. tilsætning, og startkoncentrationen 35,9 ng/ml giver nedbrydning ved 2. tilsætning. Nedbrydningsratekonstanten, K er højere ved 2. tilsætning end ved 1. tilsætning. Dette var forventet, da biomassen på dette tidspunkt har adapteret til østrogenet, og derfor lettere nedbryder det. Ved startkoncentration 19,6 ng/ml EE2 ved 1. tilsætning og 29,2 ng/ml ved 2. tilsætning ses der ingen nedbrydning. Årsagen kan være, at startkoncentrationen har været for lav, og biomassen i disse forsøg har været eksponeret for andet og mere biotilgængeligt kulstof. Ved startkoncentration 55,9 ng/ml ved 1. tilsætning ses kun svag nedbrydning, hvilket giver en halveringstid på 3466 døgn. Ved 2. tilsætning er startkoncentrationen 56,5 ng/ml EE2 og her ses ingen nedbrydning. Dette var ikke forventet, da højere koncentrationer af EE2 forventes at være mere biotilgængeligt end mindre koncentrationer.

Ved forsøget med startkoncentration 55,9 ng/ml EE2 ved 1. tilsætning er nedbrydningskinetikken af 1. orden. I sådanne tilfælde er nedbrydningen afhængig af substratkoncentrationen, det betyder, at biomassens nedbrydningskapacitet over for stoffet ikke er fuldt udnyttet. Derfor er det igen uventet, at der ingen nedbrydning er ved 2. tilsætning med startkoncentrationen 56,5, men som sagt kan det skyldes tilstedeværelsen af mere biotilgængeligt kulstof. Derudover skal det bemærkes, at denne bestemmelse af 1. orden nedbrydning er forbundet med usikkerhed, da den r-kvadrerede værdi, R^2 er tæt på nul.

Ved startkoncentrationen 26,5 ng/ml EE2 ved 1. tilsætning er der 1. orden nedbrydning og ved 2. tilsætning og en startkoncentration på 35,9 ng/ml EE2 er der tale om en 0. orden nedbrydning. Dette er et eksempel på at ved lave koncentrationer, er kapaciteten af biomassen ikke fuldt udnyttet, hvilket kommer til udtryk ved 1. orden nedbrydning. Ved den højere koncentration ses 0. orden nedbrydning, som ikke er afhængig af substratkoncentrationen, det vil sige biomassen har nået kapaciteten for, hvad der kan nedbrydes.

Ved tilsætning af henholdsvis 500 ng/ml, 1000 ng/ml og 2000 ng/ml ses startkoncentrationer ved 1. tilsætning på henholdsvis 55,9 ng/ml, 19,6 ng/ml og 26,5 ng/ml. Det var ikke forventet, at det målte koncentrationsniveau ville ligge så lavt i forhold til de tilsatte mængder. Der ses desuden heller ingen korrelation mellem tilsatte og målte koncentrationer. Samme forhold gælder ved 2. tilsætning af EE2. Forklaringen på de lave startkoncentrationer kan ligge i måleusikkerheder, og da der ikke ses nogen entydig tendens, kan der være flere faktorer, som gør sig gældende.

Ved nedbrydning i sediment fra Skive Å under anaerobe forhold er der ved 1. tilsætning og startkoncentrationen 941,2 ng/ml en større nedbrydningsratekonstant, K end ved 2. tilsætning og startkoncentrationen 81,5 ng/ml. Det kan skyldes den lavere startkoncentration ved 2. tilsætning. Det skal imidlertid bemærkes, at bestemmelsen ved 2. tilsætning er behæftet med usikkerhed, da den r-kvadrerede værdi, R^2 ligger tæt ved nul. Desuden kan nedbrydningsratekonstanten, K betragtes så lav ved 2. tilsætning, at der nærmest ingen nedbrydning er. Ved 1. og 2. tilsætning i dette forsøg ses der 1. orden nedbrydning. Det vil sige, biomassens kapacitet for nedbrydning er ikke nået.

Ved startkoncentrationen 205,8 ng/ml EE2 viser 1. tilsætning ingen nedbrydning, denne opstår til gengæld ved 2. tilsætning, hvor startkoncentrationen er 506,3 ng/ml. Det antages, at være den højere startkoncentration ved 2. tilsætning, som medvirker til, at nedbrydningen opstår, eventuelt kombineret med, at biomassen har adapteret til EE2. Desuden ses nedbrydningen som 1. orden nedbrydning, det vil igen sige, at hele biomassens kapacitet ikke er udnyttet. Årsagen kan være, at hele biomassen ikke er adapteret til østrogenet.

Ved startkoncentrationen 983,3 ng/ml ved 1. tilsætning sker der nedbrydning, men ikke ved 2. tilsætning med startkoncentrationen 89,5. Årsagen kan som nævnt skyldes den lave koncentration af EE2 ved 2. tilsætning og tilstedeværelsen af mere biotilgængeligt kulstof.

Ved disse anaerobe forsøg ses samme tendens, som ved de aerobe forsøg, at der ingen korrelation er mellem tilsatte og målte koncentrationer.

Ved disse anaerobe forsøg er der en tendens til, at nedbrydningsratekonstanten, K stiger i takt med en højere startkoncentration af EE2. Det var forventet, da større koncentrationer af EE2 er

mere biotilgængeligt end mindre koncentrationer, hvilket kan medføre den højere nedbrydningsratekonstant, K.

Ved sammenligning af det aerobe med det anaerobe forsøg fra Skive Å ses en tendens til, at halveringstiden, $T_{1/2}$ for de anaerobe forsøg ligger lavere end for de aerobe forsøg. Det var ikke forventet, da Ying & Kookana, 2003 og Ying *et al.*, 2003 ved lignende forsøg fandt de hurtigste halveringstider for EE2 under aerobe forhold. Desuden viste forsøg med sediment fra Skive Fjord udført af Thulsted & Uhre, 2005, at der forekom lavere halveringstider i de aerobe forsøg end i de anaerobe. De lavere halveringstider ved de anaerobe forsøg kan skyldes, at biomassen i dette sediment har haft bedre vilkår under opbevaring end biomassen i det aerobe sediment. Det aerobe sediment har eventuelt ikke været iltet tilstrækkeligt, og derfor er biomassen blevet svækket.

Ved nedbrydning i sediment fra den upåvirkede målestation under aerobe forhold ses der ved startkoncentrationen 1015,0 ng/ml og 1. tilsætning en lavere nedbrydningsratekonstant, K end ved 2. tilsætning og startkoncentrationen 586,1 ng/ml. Det viser som forventet, at biomassen har adapteret til EE2 ved 2. tilsætning, og derfor øger nedbrydningen. Samme tendens ses ved 1. tilsætning og startkoncentration 676,4 ng/ml, hvor der ingen nedbrydning er, men ved 2. tilsætning og startkoncentration 788,0 ng/ml er der nedbrydning. I dette tilfælde skal det nævnes, at nedbrydningen ved 2. tilsætning også kan skyldes den højere startkoncentration og ikke kun biomassens adaption til EE2. Det sidste forsøg viser, at nedbrydningsratekonstanten, K er størst ved 1. tilsætning end ved 2. tilsætning. Det skyldes sandsynligvis en større startkoncentration ved 1. tilsætning end ved 2. tilsætning.

Ved startkoncentrationen 1015,0 ng/ml EE2 ved 1. tilsætning er der 1. orden nedbrydning og ved 2. tilsætning og en startkoncentration på 586,1 ng/ml EE2 er der tale om en 0. orden nedbrydning. Bestemmelsen af 0. orden nedbrydning antages at være forårsaget af, at det er starten af forløbet af en 1. orden nedbrydning, der ses. Det vil sige ved flere målinger, ville kurven gå fra et forløb af 0. orden til et forløb af 1. orden.

Med enkelte undtagelser ses der ved disse forsøg en tendens til, at halveringstiden, $T_{1/2}$ falder i takt med højere startkoncentrationer. Dette var som sagt forventet, da østrogenet antages at være mere biotilgængeligt ved højere koncentrationer. Undtagelserne kan skyldes tilstedeværelsen af mere biotilgængeligt kulstof eller biomassens svækkelse.

Ved nedbrydning i sediment fra den upåvirkede målestation under anaerobe forhold er nedbrydningsratekonstanten, K større ved 2. tilsætning end ved 1. tilsætning for alle forsøg, hvilket tyder på, at biomassen har adapteret til østrogenet. Det kan imidlertid også skyldes, at startkoncentrationen ligger højere ved 2. tilsætning.

Ved 1. – og 2. tilsætning og startkoncentrationerne 117,1 ng/ml og 187,0 ng/ml er der 1. orden nedbrydning. Det vil sige nedbrydningen afhænger af substratet, og biomassens kapacitet er ikke fuldt udnyttet. Ved startkoncentrationen 182,1 ng/ml og 308,5 ng/ml er der 0. orden nedbrydning både ved 1. – og 2. tilsætning. Her er nedbrydningen ikke afhængig af substratet. Bestemmelsen af 0. orden nedbrydning kan som sagt være det tidlige forløb af en 1. orden nedbrydning, der ses. Ved 1. tilsætning og startkoncentrationen 110,0 ng/ml er der ingen

nedbrydning, men der ses 0. orden nedbrydning ved 2. tilsætning og startkoncentrationen 324,3 ng/ml. Det antages igen at være det tidlige forløb af en 1. orden nedbrydning, der ses.

Foruden enkelte undtagelser ses der ved disse forsøg igen en tendens til, at halveringstiden, $T_{1/2}$ falder i takt med højere startkoncentrationer. Dette var som sagt forventet, og undtagelserne kan skyldes tilstedeværelsen af mere biotilgængeligt kulstof eller biomassens svækkelse.

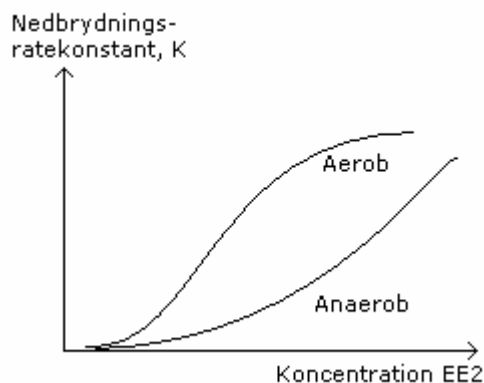
Ved sammenligning af det aerobe med det anaerobe forsøg fra den upåvirkede målestation ses den samme tendens som ved Skive Å, at nedbrydningsratekonstanterne, K for det anaerobe forsøg ligger højere end for det aerobe forsøg. De højere nedbrydningsratekonstanter, K ved de anaerobe forsøg kan som sagt skyldes, at biomassen i dette sediment har haft bedre vilkår under opbevaring end biomassen i det aerobe sediment.

Ved sammenligning af forsøgene Skive Å og de upåvirkede forsøg ses det, at nedbrydningsratekonstanterne, K generelt ligger højere ved de upåvirkede forsøg. For Skive Å er der også flere forsøg, hvor der ingen nedbrydning ses end ved de upåvirkede forsøg. Dette var ikke forventet, da det antages, at sedimentet fra Skive Å eksponeres for højere koncentrationer af EE2 end det upåvirkede sediment, da Skive Renseanlæg udleder det rensede spildevand i åen. Derfor var det forventet, at biomassen i dette sediment i højere grad havde adapteret til østrogenet end ved det upåvirkede sted. Denne iagttagelse stemmer heller ikke overens med forsøgsresultater udarbejdet af Thulsted & Uhre, 2005. Deres resultater viste større nedbrydningsrater ved udmundingen af Skive Å end ved målestationen *Resen*, som ligger nær den upåvirkede målestation. Årsagen kan være omstændigheder omkring, hvordan prøverne er behandlet, men da prøverne er behandlet ens under hele forløbet med prøvetagning opbevaring og efterbehandling, er det ikke den endelige forklaring.

Der er halveringstider, $T_{1/2}$ på 3466 og 1155 døgn for henholdsvis startkoncentrationen 55,9 ng/ml ved 1. tilsætning i sediment fra Skive Å under aerobe forhold og startkoncentrationen 81,5 ng/ml ved 2. tilsætning i sediment fra Skive Å under anaerobe forhold. Disse værdier ligger meget højere end forventet, da Ying *et al.*, 2003 opnåede en halveringstid, $T_{1/2}$ for EE2 på 81 døgn og Thulsted & Uhre, 2005 opnåede halveringstider på højst 62 døgn. Derfor betragtes disse værdier som urealistiske. De resterende halveringstider, $T_{1/2}$ betragtes som realistiske, idet de stemmer godt overens med de resultater Thulsted & Uhre, 2005 opnåede.

Plottet af startkoncentrationen mod nedbrydningsraten for de aerobe forsøg viser ingen eller kun svag tendens til at følge *Michalis-Menten* nedbrydningskinetik. Kun et enkelt punkt ligger højt ved en høj startkoncentration, de resterende ligger næsten på linje uafhængig af startkoncentrationen. Plottet af startkoncentrationen mod nedbrydningsraten for de anaerobe forsøg viser tendens til at følge *Michalis-Menten*. Der ses en eksponentiel stigning i nedbrydningsraten ved 200 ng/ml og derover. Det tyder som sagt på, at EE2 er mere biotilgængeligt for den anaerobe biomasse. Dette svarer imidlertid ikke til de tidligere nævnte resultater opnået af Ying & Kookona, 2003; Ying *et al.*, 2003 og Thulsted & Uhre, 2005. Årsagen til de forskellige resultater kan som sagt skyldes, at det aerobe sediment ikke har været iltet tilstrækkeligt under opbevaringen. Dermed er biomassen svækket i forhold til biomassen i det

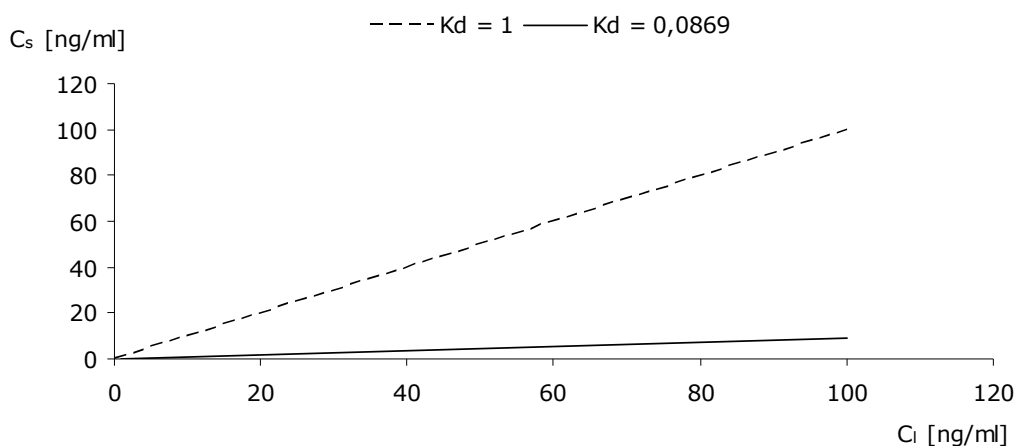
anaerobe sediment. Det forventede kurveforløb ved aerob og anaerob nedbrydning vises i et plot med koncentrationen af EE2 mod nedbrydningsratekonstanten, K se figur 8.1.



Figur 8.1 Nedbrydningsratekonstanten, K i forhold til koncentrationen af EE2 ved Aerobe og anaerobe forhold.

8.3 Diskussion af sorptionsforsøg

Sorptionskinetikken for EE2 kan beskrives med den lineære sorptions-isoterm. Det betyder, at fordelingen bestemmes af en enkelt parameter, fordelingskoefficienten, K_d . Det fremgår af figur 7.7, at fordelingskoefficienten, K_d er lig med 0,0869. Denne værdi er lavere end forventet, da EE2 ud fra en $\log K_{ow}$ på 4,15 er et apolært stof, og denne lave fordelingskoefficient, K_d under 1 indikerer, at EE2 primært vil være opløst i væskefasen. Sorptionsforsøg udført af Ying *et al.*, 2003 giver desuden en K_d værdi på 24,2; hvilket indikerer de apolære egenskaber ved EE2. Figur 8.2 sammenligner den fundne fordelingskoefficient, K_d med en fordelingskoefficient, K_d lig med 1.



Figur 8.2 Sammenligning af en ligelig fordeling af EE2, $K_d = 1$, med den fundne fordeling, $K_d = 0,0869$.

Figur 8.2 giver et visuelt billede af den lave værdi af fordelingskoefficienten, K_d . Det organiske indhold i sedimentet er også afgørende for værdien af fordelingskoefficienten, K_d . Indholdet af organisk stof i sedimentet ligger på 0,69 % dw, hvilket er en relativ lav værdi set i forhold til de øvrige indhold af organisk stof fundet i sediment fra Skive Fjord. Ved forsøgene udført af Ying *et al.*, 2003 havde det anvendte sediment et organisk indhold på 1,9 % dw, hvilket medvirker til den højere fordelingskoefficient, K_d på 24,2. Derfor antages det lave indhold af organisk stof i sedimentet og ikke i så høj grad polariteten af EE2 at være medvirkende til den lave værdi for fordelingskoefficienten, K_d .

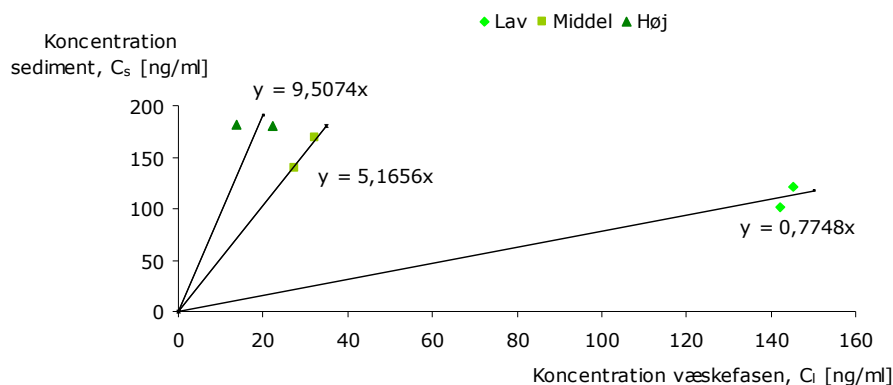
Genfindingsgraden, %REC for EE2 i kontrolforsøget er meget lav, hvilket ikke var forventet på baggrund af de høje værdier i væskefasen i det første sorptionsforsøg. Dette indikerer, at det ikke er en tendens i forsøgene, at der måles høje koncentrationer af EE2 i væskefasen. Genfindingsgraden, %REC strækker sig fra 1,3 % - 27,8 %. Årsagen til den lave genfindingsgrad, %REC kan skyldes, at der mistes EE2, eksempelvis når prøven ledes igennem C18-kolonnen. Genfindingsgraden, %REC for den interne standard ligger imidlertid på højere værdier fra 40,4 % - 138,7 %, og da den interne standard blev tilsat lige inden prøverne ledes C18-kolonnen må østrogenet i kontrolprøverne være mistet før kolonnen. En forklaring kan være, at der mistes EE2 hver gang prøveopløsningen føres fra et glas til et andet. Det kan ske ved, at EE2 sorberes til glasset og ikke føres med videre.

Da fordelingskoefficienten, K_d og indholdet af organisk stof, f_{oc} er kendte værdier, kan fordelingskoefficienten, K_{oc} mellem organisk kulstof og vand fra ligning 5.2 beregnes. Værdien for K_{oc} bliver da;

$$K_{oc} = \frac{0,0869}{0,0069} = 12,59$$

Fordelingskoefficienten mellem organisk kulstof og vand, K_{oc} angiver som sagt stoffets villighed til at sorbere. En værdi for K_{oc} på 12,59 er meget lav og indikerer at EE2 ikke særlig villigt sorberer. Dette er ikke i overensstemmelse med hvad der var forventet, da andre studier af sorption med EE2 har vist langt højere værdier. Eksempelvis fandt Ying *et al.*, 2003 en K_{oc} -værdi på 4840 for EE2 og konkluderer ud fra forsøgene, at østrogener, herunder EE2, er hydrofobe og danner stærke bindinger med sediment og jordpartikler. Det må antages, at den fundne K_{oc} - værdi er usædvanlig lav.

Forsøg 2 bekræfter som forventet, at fordelingskoefficienten, K_d afhænger af indholdet af organisk stof i sedimentet. Ved at lægge en ret linje fra målepunkterne og gennem nulpunktet kan fordelingskoefficienten, K_d bestemmes, se figur 8.3.



Figur 8.3 Fordelingskoefficienten, K_d i forhold til lavt, middel eller højt indhold af organisk stof i sedimentet.

Da indholdet af organisk stof i sedimentet, f_{oc} og fordelingskoefficienten, K_d er kendte værdier kan fordelingskoefficienten mellem organisk kulstof og vand, K_{oc} beregnes ud fra ligning 5.2. Resultatet fremgår af tabel 8.1.

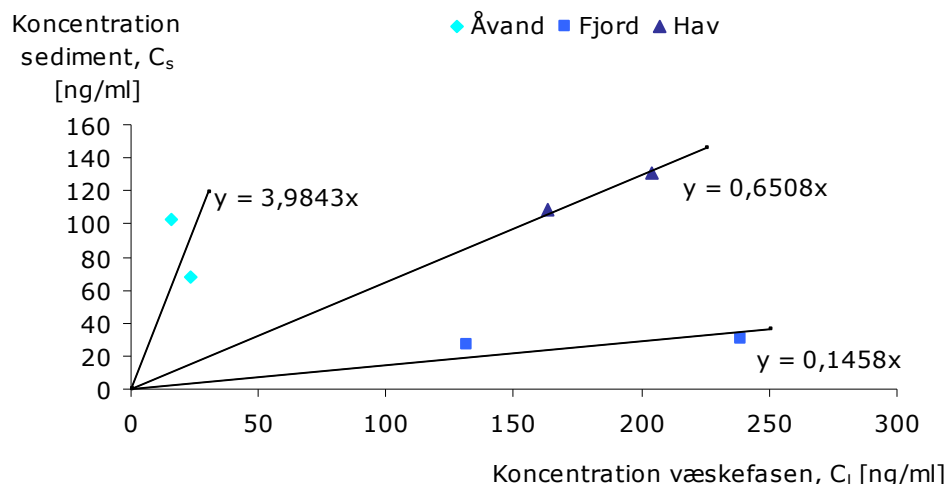
Tabel 8.1

	K_d	f_{oc}	K_{oc}
Lav	0,7748	0,0069	112,3
Middel	5,1656	0,032	161,4
Høj	9,5074	0,049	194,0

De beregnede K_{oc} – værdier ligger stadig lavt i forhold til den værdi Ying *et al.*, 2003 fandt, og på baggrund af den høje K_{ow} -værdi for EE2 anses denne for at være mere realistisk. Det er tilsyneladende en tendens, der går igen i forsøgene, at der ikke ekstraheres så meget EE2 fra sedimentfasen. Der kan være et led i denne ekstraktion, hvor noget går tabt. Dette afkræftes imidlertid af de fundne genfindingsgrader, %REC for den interne standard i forsøgene, da 4/5 af disse ligger over eller lige omkring 100 %.

Det er ikke kun indholdet af organisk stof, der kan påvirke fordelingskoefficienten, K_d men også kornstørrelsesfordelingen i sedimentet kan have en betydning. Jo mere finkornet sedimentet er, desto større overflade har det. Det betyder, at der er et større areal, hvor stof kan sorberes. Finkornet sediment kan dermed sorbere mere, end grovkornet sediment. Det blev fundet, at det sediment med det højeste indhold af organisk stof også var det mest finkornede. Sedimentet med det laveste indhold af organisk stof var ligeledes det mest grovkornede. Denne sammenhæng mellem organisk indhold og kornstørrelsesfordeling var forventet. Det skyldes, at strømningsforholdene i vandige miljøer er afgørende for, hvor fint et materiale der kan sedimenteres, herunder sedimentpartikler og organiske partikler. Det vil sige, fundet af de højere K_d - værdier i sedimentet med det høje indhold af organisk stof sandsynligvis ikke kun skyldes dette men også den større overflade i sedimentet.

Ud fra forsøg 3 sorberes EE2 hovedsagelig til sedimentet ved en vandfase med lav salinitet, åvandet. Den mindste grad af sorption ses ved en vandfase med middel salinitet, fjordvand. Figur 8.4 viser fordelingskoefficienten, K_d i forhold til, det er å-, fjord eller havvand, der er anvendt som vandfase.



Figur 8.4 Fordelingskoefficienten, K_d i forhold til anvendelse af åvand, fjord eller havvand.

Fordelingskoefficienten, K_d korrelerer ikke med stigende salinitet i vandfasen. Dette er imidlertid ikke i overensstemmelse med forventningen. Forsøg udført af Ying *et al.*, 2003 viste, at der var korrelation mellem stigende salinitet og stigende fordelingskoefficient, K_d .

Forsøgene ligger resultatmæssigt langt fra Ying *et al.*, 2003. Forsøgsbetingelserne og protokollen for udførelsen af forsøgene, er udarbejdet på baggrund af Ying *et al.*, 2003, derfor antages der ikke at være omstændigheder omkring dette, der kan skyldes den store forskel i resultater. Derfor må fysiske og kemiske betingelser omkring væskefasen og sedimentet i forsøgene udgøre en del af forklaringen. For Ying *et al.*, 2003 udgør sand 83 % af sedimentets sammensætning, ler udgør 3,1 % og silt 1,1 %. Dette betegner et forholdsvist finsandet sediment, og da sedimentet fra nærværende forsøg ligeledes er finsandet ifølge kornstørrelsesfordelingen vist i figur 7.12, antages dette ikke at udgøre den største årsag til forskellene. Indholdet af organisk stof i sedimentet udgør som nævnt en væsentlig betydning ved sorption af EE2. Det organiske indhold i sedimentet anvendt af Ying *et al.*, 2003 var 1,9 % dw. Dette indhold antages at være så væsentlig højere end det organiske indhold på 0,69 % dw, som forekommer i det anvendte sediment, at det kan betragtes som den primære årsag til forskellene i forsøgsresultater.

8.4 Samlet diskussion

Med de udførte forsøg kan det antages, at ved udledning af EE2 fra Skive Renseanlæg vil det i åløbet primært sorbere til sedimentet. Der vil forekomme biotisk nedbrydning både ved aerobe og anaerobe forhold. Ved udmundingen af Skive Å kan der forventes halveringstider på omtrent 0,3 til 365 døgn. Idet EE2 er ledt ud i fjorden, vil det primært befinde sig i væskefasen og dermed føres med strømmen. Ledes det til områder af fjorden, som er upåvirkede af ferskvandet fra Skive Å, vil det nedbrydes af biomassen med halveringstider på 0,8 til 61 døgn. Ved områder med høje koncentrationer af organisk stof i sedimentet vil det sorberes hertil. Der er ikke observeret koncentrationer af EE2 i Skive Fjord, men ud fra bestemmelsen af organisk stof er der størst sandsynlighed for, at det befinder sig i de dybe områder af fjorden.

Ved sammenligning af EE2 i forhold til andre østrogener og østrogene stoffer er det muligt at danne et billede af, hvor stor en risiko stoffet reelt udgør ved udledning til naturen. Samtidig kan det vurderes, om der er andre stoffer, som er mere risikobetonede i forhold til miljøet end EE2. Der ses på følgende stoffer; de naturlige østrogener E1 og E2, det industrielle kemikalie; bisphenol A, overflade nedbrydningsprodukterne; 4-tert-octylphenol og 4-n-nonylphenol samt EE2. Tabel 8.2 viser resultaterne for halveringstider, $T_{1/2}$, fordelingskoefficienten, K_d og oktanol/vand fordelingskoefficienten, K_{ow} .

Tabel 8.2

Stof	$T_{1/2}$	K_d	Log K_{ow}
E1**	2-3	-	3,43
E2*	2	21,8	3,94
EE2*	81	24,2	4,15
Bisphenol A*	IN	3,89	3,32
4-t-Octylphenol*	IN	90,9	4,12
4-n-Nonylphenol*	7	195	4,48

* [Ying *et al.*, 2003], ** [Ying *et al.*, 2002]

Ved sammenligning af EE2 i forhold til andre østrogene stoffer, fremgår det af tabel 8.2, at det har en middel evne til at sorbere og er langsomt men dog nedbrydeligt. Derfor er det interessant at vide, i hvor høj grad EE2 er i stand til at påvirke omgivelserne i forhold til de andre stoffer. Det kan give et samlet billede af, hvor alvorligt udledning af EE2 er.

Den mindste dosis LOEC (Lowest observable effect concentration), der kan medføre kønsforstyrrelser hos fisk, er undersøgt ved kontrollerede eksponeringsforsøg [Miljøprojekt no. 729, 2002]. Tabel 8.3 opsummerer et udvalg af resultaterne.

Tabel 8.3 LOEC for kønsforstyrrelser hos fiskepopulationer.

Stof	Dannelse af vitellogenin	Intersex	Andre kønsforstyrrelser
E1	30 ng/l	10 ng/l	-
E2	5 ng/l	10 ng/l	10 – 50 ng/l
EE2	0,1 ng/l	0,1 ng/l	0,6 – 10 ng/l
Bisphenol A	10 – 40 µg/l	10 – 40 µg/l	10 – 40 µg/l
4-t-Octylphenol	5 µg/l	-	2 µg/l
4-n-Nonylphenol	5 µg/l	30 – 100 µg/l	30 – 100 µg/l

[Miljøprojekt no. 729, 2002]

EE2 er op til en faktor 10.000 mere potent end de andre østrogener og østrogenlignende stoffer nævnt i tabel 8.3. De ovennævnte doser, der medvirker til kønsforstyrrelser, sammenlignes med spildevandskoncentrationer fra renseanlæg og koncentrationer i overfladevand for at vurdere, om der er en risiko ved udledningen. Tabel 8.4 angiver målte koncentrationer i spildevand og i overfladevand fra internationale målinger.

Tabel 8.4 Målte koncentrationer i spildevand og overfladevand.

Stof	Spildevand	Overfladevand
E1	0,1 – 220 ng/l	< 0,1 – 17 ng/l
E2	< 0,1 – 88 ng/l	0,05 – 15,5 ng/l
EE2	< 0,053 – 62 ng/l	< 0,053 – 30,8 ng/l
Bisphenol A	< 1 µg/l	< 1 µg/l
4-t-Octylphenol	< 10 µg/l	-
4-n-Nonylphenol	< 10 µg/l	-

[Miljøprojekt no. 729, 2002]

Østrogenerne E1, E2 og EE2 udgør en potentiel risiko for at forårsage kønsforstyrrelser hos fiskepopulationer, da de kan forekomme i koncentrationer i overfladevand, der overstiger de koncentrationer, der medfører kønsforstyrrelser, jf. tabel 8.3 og tabel 8.4. Bisphenol A udgør umiddelbart ingen risiko for fiskepopulationer, da koncentrationen i spildevandet og overfladevandet ikke overgår de koncentrationer, som medvirker til kønsforstyrrelser. 4-t-Octylphenol og 4-n-Nonylphenol antages heller ikke umiddelbart at udgøre nogen risiko, da koncentrationen i spildevandet kun udgør det dobbelte af den koncentration, der medfører kønsforstyrrelser. Spildevandet formodes at blive fortyndet væsentligt ved udledning til recipienten, hvilket medfører en koncentration i overfladevandet, der ikke udgør nogen fare for fiskepopulationen.

Da E1 og E2 jf. tabel 8.2 har halveringstider, $T_{1/2}$ på 2 -3 døgn, antages disse ikke at medføre en umiddelbar risiko for kønsforstyrrelser hos fisk. EE2 har en halveringstid, $T_{1/2}$ på 81 døgn. Derfor antages EE2 at medføre en potentiel risiko for kønsforstyrrelser hos fiskepopulationer i recipienten.

Ud fra de angivne K_d og $\log K_{ow}$ – værdier i tabel 8.2 har alle stofferne potentiale for at sorbere til sedimentet. Dermed kan akkumulering af stofferne forekomme, hvilket kan medføre koncentrationer, der giver kønsforstyrrelser. For Bisphenol A og 4-t-Octylphenol er der en særlig risiko for akkumulering, da der jf. tabel 8.2 ingen nedbrydning er observeret for disse stoffer. Halveringstiderne, $T_{1/2}$ for de resterende stoffer med undtagelse af EE2, medvirker til, at risikoen fra dem ikke anses for potentiel.

Med ovenstående kan det antages, at Bisphenol A og 4-t-Octylphenol reelt kan udgøre en risiko for at medføre kønsforstyrrelser hos fiskepopulationer, men da forekomsten af stofferne primært er i sedimentet, vil eksponeringen af fiskepopulationen være begrænset. Der kan imidlertid være andre bundlevende dyr, som vil påvirkes af stofferne.

Ud fra disse betragtninger anses EE2 blandt de undersøgte stoffer at udgøre den største risiko for omgivelserne.

Ud fra de udførte forsøg i nærværende projekt kunne et løsningsforslag være, at der rent faktisk blev udledt mere EE2 fra renseanlægget. Dette ville medføre, at biomassen startede nedbrydning af EE2. Samtidig antages det, at udledning af E1 og E2 ville medføre en synergieffekt i forhold til biomassens nedbrydning af EE2. Alternativet ville være effektivisering af renseanlæggets fjernelse af EE2. Forsøg udført af Shi *et al.*, 2002 viste, at en opholdstid i det aktive slam på op til 48 timer fjernede 20 % af EE2. En forlængelse af opholdstiden i anlægget vil dermed være urealistisk. Suzuki *et al.*, 2002 har vist, at enzymer fra en svamp (White rot fungi) kan nedsætte den østrogene aktivitet til 10-20 % efter en times behandling for E2 og EE2, og fjerne den helt indenfor 8 timer. Denne behandlingsmetode kunne blive den fremtidige løsning på fjernelse af EE2 på renseanlægget.

9 Konklusion

Der er en begrænset viden om konsekvenserne ved udledning af det kunstige østrogen 17 α -ethyløstradiol, EE2. Det indbefatter både, hvordan EE2 nedbrydes, og hvordan det sorberes og ikke mindst, hvad det kan medføre for miljøet. Denne rapport belyser, konsekvenserne for EE2, når det udledes til recipienten Skive Fjord.

EE2 er et apolært stof, der overvejende bindes til det organiske stof i sedimentet. Ud fra kendskabet til det organiske indhold i sedimentet er det dermed muligt at bestemme, hvor EE2 kan forventes at befinde sig. Denne sammenhæng er fundet ved Skive Fjord. EE2 samt de naturlige østrogen østron, E1 og 17 β -østradiol, E2 er detekteret i områder med høje indhold af organisk stof i sedimentet.

EE2 kan nedbrydes under både aerobe og anaerobe forhold. Nedbrydningen foregår udelukkende biotisk. Nedbrydningsraten ved *in-situ* koncentrationer er meget lille. Tilsætning af højere koncentrationer af EE2 giver derimod en betydelig stimulering af nedbrydningsraten.

Ved nedbrydning i sediment fra et upåvirket område blev det fundet, at biomassen skulle adaptere til EE2. Det viste sig ved, at nedbrydningsraterne var højere ved 2. tilsætning af EE2.

EE2 nedbrydes med halveringstider, $T_{1/2}$ på 0,3 døgn og op til 365 døgn.

De anaerobe forsøg følger *Michalis-Menten* modellen ved et plot af koncentrationen af EE2 mod nedbrydningsraten. Når biomassen eksponeres for en koncentration af EE2 på omtrent 200 ng/ml og derover, ses der en eksponentiel stigning af nedbrydningsraten.

EE2 følger en lineær sorptionskinetik. Det befinder sig primært i vandfasen ved sediment med lavt indhold af organisk stof. Det kan konstateres, at graden af sorption for EE2 stiger med stigende koncentration af organisk stof. Det blev fundet, at et organisk indhold i sedimentet over 3,2 % dw medfører, at EE2 primært sorberer til sedimentet. Samtidig ses en sammenhæng, hvor graden af sorption for EE2 stiger ved mere finkornet sediment.

Ud fra Miljøprojekt no. 729, 2002; Ying *et al.*, 2002 og Ying *et al.*, 2003 sammenlignes EE2 med et udvalg af naturlige østrogen og østrogenlignende stoffer og blev fundet til at være op mod 10.000 gange mere potent. Koncentrationsmålinger af EE2 i overfladevand overstiger samtidig LOEC (Lowest Observable Effect Concentration) for kønsforstyrrelser hos fiskepopulationer. Da EE2 har en middel fordelingskoefficient, K_d og er langsomt nedbrydeligt, konstateres det, at EE2 udgør langt den største risiko for omgivelserne. Derfor vurderes det, at renseforanstaltninger på renseanlæggene bør udvikles således, at fjernelsen af EE2 skærpes.

Referencer

- [Alexander, 1999] M. Alexander
Biodegradation and Bioremediation
Department of Soil, Crop, and Atmospheric Sciences, College of
Agriculture and Life Sciences
Cornell University, Ithaca, New York
- [Alltech, 1997] Alltech Associates Inc.
Calculations Involved For Quality Control In EPA Methods
Application Note ANE003, Alltech Associates Inc., 2051
Waukegan Road, Deerfield
- [Baronti *et al.*, 2000] C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R.
Samperi
*Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge
Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water*
Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma, Italy
- [Bech, 2003] M. Bech
*Filtratorer i Skive Fjord i 2003 –En opgørelse af
blåmuslingebestanden*
Bio/Consult as for Viborg Amt
- [Bjerregaard, 2005] P. Bjerregaard
Økotoksikologi
Gyldendals Boghandel, Nordisk Forlag A/S, København
- [Braga *et al.*, 2005] O. Braga, G.A. Smythe, A. I. Schäfer, A. J. Feitz
Steroid estrogens in ocean sediments
University of New South Wales, Sydney, Australia
- [Connell *et al.*, 1999] D. Connell, School of Public Health, Griffith University,
Queensland, Australia, P. Lam, B. Richardson og R. Wu,
Department of Biology and Chemistry, City University of Hong
Kong
Introduction to Ecotoxicology
Blackwell Sciences Ltd

- [Frisk, 2004] C. Frisk
Vurdering af mikrobiel nedbrydning af østrogener i marint sediment
Afgangsprojekt 7. semester, Aalborg Universitet
- [Hanselman *et al.*, 2003] T. A. Hanselman, D. A. Graetz, A. C. Wilkie
Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review
Soil and water Sciences Department, University of Florida
- [Hansen *et al.*, 2007] K. B. Hansen, M. G. G. Larsen, E. Baatrup
Fisk på p-piller
Artikel, Aktuell Naturvidenskab nr. 5, 2007
- [Harremoës *et al.*, 1997] P. Harremoës, A. Malmgren-Hansen
Lærebog i vandforurening
Polyteknisk Forlag, Lyngby
- [Harris, 2003] D. C. Harris, Michelson Laboratory, China Lake, California
Quantitative Chemical Analysis
W. H. Freeman and Company, New York
- [Ingerslev *et al.*, 2003] F. Ingerslev, B. Halling-Sørensen
Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment
Arbejdsrapport nr. 44, Miljøstyrelsen
- [Kjærgaard & Ringsted, 1998] M. Kjærgaard, J. P. Ringsted
Naturlig nedbrydning af miljøfremmede stoffer i jord og grundvand
Miljøstyrelsen, Geoteknisk Institut og Institut for Miljøteknologi, Danmarks Tekniske Universitet
- [Kuster *et al.*, 2004] M. Kuster, M. J. López de Alda, D. Barceló
Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments
Department of Environmental Chemistry, Barcelona, Spain

- [Lee *et al.*, 2003] L. S. Lee, T. J. Strock, A. K. Sarmah, P. S. C. Rao
Sorption and Dissipation of Testosterone, Estrogens, and Their Primary Transformation Products in Soil and Sediment
Department of Agronomy and School of Civil Engineering, Purdue University, West Lafayette, Indiana
- [Løll & Moldrup, 2000] P. Løll, Danish Environmental Consulting, P. Moldrup, Aalborg University
Soil Characterization and Polluted Soil Assessment
M. Sc. Course, Aalborg University
- [López de Alda *et al.*, 2002] M. J. López de Alda, A. Gil, E. Paz, D. Barceló
Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry
Department of Environmental Chemistry, Barcelona, Spain
- [Madsen *et al.*, 2003] G. Madsen, H.-E. Jensen, N. H. W. Nielsen
Vandmiljøplanens overvågningsprogram
Viborg Amt, Miljø og Teknik
- [Maier *et al.*, 2000] R. M. Maier, I. L. Pepper, C. P. Gerba, Department of Soil and Water Science, University of Arizona
Environmental Microbiology
Academic Press, California, USA
- [Miljøprojekt no. 729, 2002] L. Bachmann Christiansen, University of Southern Denmark, M. Winther-Nielsen, C. Helweg, DHI-Water & Environment
Feminisation of fish –The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature
Danish Ministry of the Environment
- [Miljøprojekt nr. 799, 2003] J. Kjølholt, P. Nielsen, F. Stuer-Lauridsen, Cowi A/S
Hormonforstyrrende stoffer og lægemidler i spildevand
Miljøstyrelsen
- [Miljøprojekt no. 899, 2004] J. Kjølholt, F. Stuer-Lauridsen, T. D. Blicher, Cowi A/S
H. R. Andersen, M. Hansen, F. Ingerslev, B. Halling-Sørensen, Danish University of Pharmaceutical Sciences
Degradation of Estrogens in Sewage Treatment Processes
Danish Ministry of the Environment

- [Plesner, 2003] T. Plesner
Undersøgelse af østrogene stoffer I Voel Bæk og tilløb
Århus Amt, Natur- og Miljøkontoret
- [Rasmussen *et al.*, 2001] L. Rasmussen og M. Laursen Ringkøbing Amt, J. Deding, B. Jensen, F. Larsen og E.-M. Platz Viborg Amt, S. Å. Bendtsen og P. Blanner Nordjyllands Amt
Vandmiljø i Limfjorden 2000
Limfjordsovervågningen, Ringkøbing Amt, Viborg Amt og Nordjyllands Amt
- [Rodgers-Gray *et al.*, 2000] T. P. Rodgers-Gray, S. Jobling, S. Morris, C. Kelly, S. Kirby, A. Janbakhsh, J. E. Harries, M. J. Waldock, J. P. Sumpter, C. R. Tyler
Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish
Department of Biological Sciences, Brunel University, U.K.
- [Shi *et al.*, 2002] J. H. Shi, Y. Suzuki, B.-D. Lee, S. Nakai, M. Hosomi
Isolation and characterisation of the ethynylestradiol-biodegrading microorganism Fusarium proliferatum strain HNS-1
Department of Chemical Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
- [Suzuki *et al.*, 2002] K. Suzuki, H. Hirai, H. Murata, T. Nishida
Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethynylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi
Department of Forest Resources Sciences, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan
- [Ternes *et al.*, 1999] T. A. Ternes, P. Kreckel, J. Mueller
Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge
ESWE-Institute for Water Research and Water Technology, Wiesbaden, Germany
- [Thulsted & Uhre, 2005] L. Thulsted Nielsen, S. Uhre Kristoffersen
Vurdering af østrogenforurening i Skive Fjord
Afgangsprojekt, Aalborg Universitet

- [Xiao *et al.*, 2001] X. Xiao, D. V. McCalley, J. McEvoy
Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives
 University of the West of England
- [Ying *et al.*, 2002] G. Ying, R. S. Kookana, Y. Ru
Occurrence and fate of hormone steroids in the environment
 Adelaide Laboratory, Australia
- [Ying *et al.*, 2003] G. Ying, R. S. Kookana, P. Dillon
Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material
 Adelaide Laboratory, Australia
- [Ying & Kookana, 2003] G. Ying og R. S. Kookana
Degradation of Five selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment
 Adelaide Laboratory, Australia

Internet

- [DMU.dk, 11.04.08] http://www2.dmu.dk/1_om_dmu/2_tvaer-funk/3_fdc_hyd/hyd_db/vibq.asp
- [Limfjord.dk, 07.04.08] http://www.limfjord.dk/om_fjord.htm
- [MST.dk, 11.04.08] <http://www2.mst.dk/common/Udgivramme/Frame.asp?http://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/2000/87-7944-298-6/html/bred02.htm>
- [Skive.dk, 11.04.08] <http://www.skive.dk/sw102262.asp>

Bilag 1 Standarder og standardrække

Forberedelser

Alle glasvarer glødes i 2-3 timer ved 450 ° C før brug, alle låg til pyrex glas skylles med hexan før brug.

Materialer

Varmeovn, 450° C

Målekolber, 10 ml/20 ml

Varmeovn, 30° C

Rystebord, 150 rpm

Stanniol

Pyrex rør, 10 ml

Varmeblok, Block Heater, Stuart Scientific (Bie & Berntsen)

Glas pasteur pipette

Vail med indsats, 150 µl

Kemikalier

Intern standard, methyl tricosanoate, 99 %, Aldrich Chem. Co.

E1, estron, minimum 99 %, Sigma-Aldrich

E2, 17 β-estradiol, minimum 98 %, Sigma-Aldrich

EE2, 17 α-ethinylestradiol, minimum 98 %, Sigma-Aldrich

Fluka II (MTSFA)

Methanol, 1.06007.2500, purity ≥ 99,9 %, Merck

Ethanol 96 % vol, PH. EUR, De Danske Spritfabrikker

Acetone, 2-propanon, Merck

Kvælstof

n-Hexan, purity ≥ 98,0 %, Merck

Standard stamopløsning

Der laves en stamopløsning på 2,5 mg/ml for hvert østrogen samt den interne standard.

Fremgangsmåde

1. Der afvejes 25 mg/50 mg af den aktuelle standard som overføres til en 10 ml/20 ml målekolbe, således at en koncentration på 2,5 mg/ml opnås.
2. Der fortyndes med methanol, og prøverne opbevares mørkt ved indpakning med stanniol.
3. For at fremme opløsningen af standarderne sættes prøverne på rystebord ved 150 rpm i varmeovn ved 30° C. Fuld opløsning tager 2-4 dage.

Standardrække

Der laves en standardrække ved tripelbestemmelse for hvert enkelt østrogen og intern standard med koncentrationerne; 10.000 ng/ml, 5.000 ng/ml, 2.500 ng/ml, 1000 ng/ml, 500 ng/ml og 100 ng/ml

Fremgangsmåde

1. De aktuelle standarder overføres til et 10 ml pyrex rør.
2. Pyrex røret placeres i varmeblok og væsken inddampes ved 50-55° C under udblæsning med kvælstof.
3. Standarderne genopløses ved at skylle glassets sider med 1 ml acetone.
4. Lidt af gangen med glas pasteur pippette overføres acetonen med de opløste standarder til en vial med en indsats, der kan rumme ca. 150 µl, denne placeres i varmeblok ved 60° C, og efterhånden som acetonen i indsatsen fordampes, kan der overføres det resterende.
5. Når al acetone er fordampet i indsatsen derivatiseres prøven.
6. Der overføres til indsatsen 50 µl MSTFA, med dette skylles siderne i indsatsen, således at det sikres at alt indtørret stof genopløses.
7. Herefter derivatiseres prøven under låg i varmeblok ved 60° C i en time og er dermed klar til analyse på GC eller GC-MS. Der foretages en kvalitetskontrol af målingerne, for yderligere oplysning se Appendiks B *Kvalitetskontrol af målinger på GC*.

Bilag 2 Ekstraktion af østrogener

Indholdet af østrogen bestemmes i sedimentprøver udtaget i Skive Fjord. Der er udtaget sedimentprøver fra 12 stationer. Prøvestationerne fremgår af figur 6.2 i afsnittet *Metoder*.

Forberedelser

Alle glasvarer glødes i 2-3 timer ved 450 ° C før brug, alle pyrex låg skyldes med hexan før brug.

Der laves standardkurver for E1, E2 og EE2, se *Bilag 1 Standarder og standardrække*.

Materialer

Fryseposer

Varmeovn, 60° C

Varmeovn, 450° C

Foliebakker

Morter

Vægt

Pyrex rør, 35 ml

Pyrex rør, 10 ml

Glas pasteur pippette

Rystebord

Centrifuge,

Varmeblok, Block Heater, Stuart Scientific (Bie & Berntsen)

C18-kolonne, Isolute SPE columns, 500 mg, C18, 6 ml

Kemikalier

n-Hexan, purity \geq 98,0 %, Merck

Intern standard, methyl tricosanoate, 99 %, Aldrich Chem. Co.

Ethylacetat, min. 99,8 %, VWR

Fluka II (MSTFA)

Methanol, purity \geq 99,9 %, Merck

Ethanol 96 % vol, PH. EUR, De Danske Spritfabrikker

Milli-Q vand

Acetone, Merck

Kvælstof

Prøvetagning

Sedimentprøver til ekstraktion af østrogener er udtaget med et plexiglasrør, der bores ned i sedimentet. Herved optages en sedimentsøjle med en diameter på 5,3 cm og en længde på ca. 30 cm. Fra sedimentsøjlen udtages en skive af sediment i dybden 0-2 cm. Der udtages en prøvemængde for hver prøvestation svarende til ca. 75 g tørret sediment, hvilket betyder at for hver prøvestation udtages fire sedimentsøjler, og den samlede prøvemængde puljes sammen. Prøverne opbevares i fryseposer og nedkøles, således at den biologiske aktivitet standses. Fremgangsmåden er udarbejdet med udgangspunkt i Ying *et al.*, 2003, Thulsted & Uhre, 2005 og Frisk, 2004.

Fremgangsmåde

4. For hver prøvestation udtages ca. 130 g våd sedimentprøve, som tørres i foliebakker ved 60° C i ca. 48 timer og homogeniseres derefter i en morter.
5. Prøven består af ca. 75 g tørret sediment, der fordeles a 6 x 12,5 g prøve til seks stk. 35 ml pyrex rør.
6. De seks prøver tilsættes hver 20 ml ethylacetat og 500 ng intern standard og de ekstraheres på rystebord ved 150 rpm i to timer.
7. Prøverne centrifugeres ved 3000 rpm i 10 minutter og supernatanten udtages med en glas pasteur pipette til et 35 ml pyrex rør, det undgås at medtage partikler fra sedimentet
8. Sedimentprøverne tilsættes 10 ml ethylacetat og ekstraheres igen i ca. to timer på rystebord ved 150 rpm.
9. Prøverne centrifugeres ved 3000 rpm i 10 minutter og supernatanten udtages igen med en glas pasteur pipette til det samme 35 ml pyrex rør, det undgås at medtage partikler fra sedimentet
10. Den samlede væske centrifugeres ved 3000 rpm i 10 minutter, og supernatanten dekanteres over i et nyt 35 ml pyrex glas.
11. Væsken inddampes til tørstof i en varmeblok ved ca. 60° C og under udblæsning af kvælstof.
12. Ekstraktet genopløses ved at skylle siderne på glasset med 3 x 0,5 ml ethanol og dette overføres til et 10 ml pyrex glas.
13. Dette gøres for alle seks pyrex glas tilhørende den samme prøve, således at væsken fra alle glas samles.
14. Ethanol-opløsningen hældes igennem en C18-kolonne for at filtrere evt. partikler fra.
15. C18-kolonnen klargøres ved at lade 2 x 10 ml methanol og derefter 1 x 10 ml milli-Q vand trække igennem kolonnen.
16. Det er vigtigt at kolonnen holdes gennemfugtet, dvs. der lukkes af for kolonnen inden det sidste milli-Q vand er løbet igennem.

17. Kolonnen åbnes og ethanol-opløsningen fra prøven hældes i, når al opløsningen er trukket igennem, placeres kolonnen på et vakuum-sug og kolonnen suges tør i 30-40 minutter.
18. Dernæst hældes 2 x 5 ml methanol gennem kolonnen og dette opsamles i 10 ml pyrex glas.
19. Den opsamlede methanol-opløsning inddampes til tørstof i en varmeblok ved ca. 50-55° C og under udblæsning af kvælstof.
20. Tørstoffet genopløses ved at skylle glassets sider med 1 ml acetone.
21. Lidt af gangen med glas pasteur pipette overføres acetonen til en vial med en indsats, der kan rumme ca. 150 µl, denne placeres i varmeblok ved 60° C, og efterhånden som acetonen i indsatsen fordampes, kan der overføres det resterende.
22. Når al acetone er fordampet i indsatsen derivatiseres prøven.
23. Der overføres til indsatsen 50 µl MSTFA, med dette skylles siderne i indsatsen, således at det sikres at alt indtørret stof genopløses.
24. Herefter derivatiseres prøven under låg i varmeblok ved 60° C i en time og er dermed klar til analyse på GC eller GC-MS. For nærmere oplysning om måling på GC eller GC-MS se Appendiks A.

Bilag 3 Bestemmelse af tørstof og glødetab

Sedimentprøver til bestemmelsen af tørstof og glødetab er udtaget med en prøvetager bestående af et plexiglasrør, der bores ned i sedimentet. Herved optages en sedimentsøjle med en diameter på 5,3 cm. Fra sedimentsøjlen udtages fra valgte dybder skiver af sediment. Tørstof og glødetab er bestemt ud fra Dansk Standard 204. Der udtages en prøvemængde a 4 ml, således at densiteten af sedimentet bestemmes.

Materialer:

Foliebakker

Vægt

Varmeovn 105 ° C

Glødeovn 550 ° C

Exsikkator

Pincet

Fremgangsmåde:

1. Foliebakkerne markeres og afvejes
2. Sedimentprøver a 4 ml afvejes
3. Foliebakker med prøver tørres i varmeovn ved 105 ° C i cirka 22 timer
4. Prøverne afkøles i eksikkator og afvejes
5. Foliebakker med prøver glødes i glødeovn i mindst 2 timer
6. Prøverne afkøles i eksikkator og afvejes

Beregning af tørstofindhold:

$$X = \frac{a - b}{c - b}$$

Hvor,

X = prøvens tørstofindhold [g/g]

a = massen af foliebakke med rest efter tørring [g]

b = masse af foliebakke [g]

c = masse af foliebakke med våd sedimentprøve [g]

Beregning af gløderest:

$$Y = \frac{d - b}{c - b}$$

Hvor,

Y = prøvens gløderest [g/g]

a = massen af foliebakke med rest efter glødning [g]

b = masse af foliebakke [g]

c = masse af foliebakke med våd sedimentprøve [g]

Beregning af glødetab:

$$Z = X - Y$$

Hvor,

Z = prøvens glødetab [g/g]

X og Y er som ovenfor

Resultater og rådata fremgår af bilag 11 *Gløde og tørstofbestemmelse* på cd-rom.

Bilag 4 Nedbrydning af østrogen

Det undersøges, hvordan bakterier nedbryder østrogen ved to prøvestationer i Skive Fjord. Den første prøvestation er i turbiditetszonen ved udløbet af Skive Å, hvorfra det rensede spildevand fra Skive Renseanlæg ledes ud i fjorden. Den anden prøvestation er nummer 22, som ligger ud for vestkysten ca. 4 km nord for udmundingen af Skive Å. På denne målestation antages det, at der ingen påvirkning forekommer fra Skive Å. Nedbrydning af østrogen undersøges i en blanding af sediment og fjordvand. Ved forsøg, som udføres aerobt, er sedimentet udtaget i 0-2 cm dybde, ved forsøg, som udføres anaerobt, er sedimentet udtaget i 2-4 cm dybde. Sedimentet opbevares i plasticspande under låg ved 5° C. Alle forsøg udføres med dobbeltbestemmelse. Forsøgene udføres med koncentrationer af EE2 på henholdsvis; 500 ng/ml, 1000 ng/ml og 2000 ng/ml. Desuden udføres et kontrolforsøg for abiotisk omsætning, hvor sediment og fjordvand er autoklaveret inden tilsætning af EE2.

Forberedelser

Alle glasvarer glødes i 2-3 timer ved 450 ° C før brug, alle låg til pyrex glas skylles med hexan før brug.

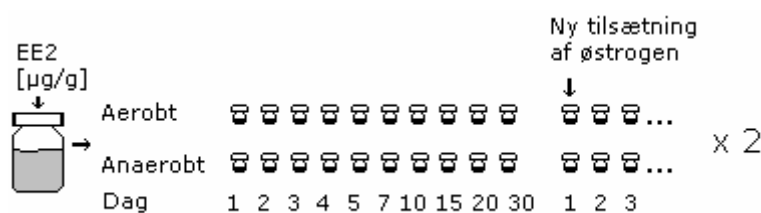
Materialer

Bluecap flasker
Vatpropper
120 ml serumflasker
Butyl gummipropper (apodan)
Rystebord
Autoklave
Varmeovn 60° C
Fryser -18° C

Kemikalier

n-Hexan, purity $\geq 98,0$ %, Merck
Intern Standard, methyl tricosanoate, 99 %, Aldrich Chem. Co.
EE2, 17 α -ethinylestradiol, minimum 98 %, Sigma-Aldrich
Kvælstof

Principskitse



Figur B4.1. Principskitse med angivelse af omtrent hvor mange dage, prøven har været inkuberet inden dens indhold af østrogen bestemmes. Efter ca. 10-15 og op til 30 dages inkubering foretages 2. tilsætning af EE2.

Fremgangsmåde

1. 500 ml fjordvand blandes med 500 ng/ml EE2 i en 1000 ml bluecap flaske, således at blandingen er homogen. Dette pkt. samt alle nedenstående pkt. gentages med en koncentration af østrogen i fjordvandet på henholdsvis 1000 ng/ml og 2000 ng/ml.
2. Der overføres 10 g sediment fra 0-2 cm dybde til 2 x 10 stk. 120 ml serumflasker, hertil tilføres 10 ml fjordvand med østrogen. Flaskerne lukkes med autoklaverede vatpropper, således at aerobe forhold bibeholdes og kontaminering undgås.
3. Der overføres 10 g sediment fra 2-4 cm dybde til 2 x 10 stk. 120 ml serumflasker, hertil tilføres 10 ml fjordvand med den udvalgte koncentration af østrogen.
4. For at opnå en anaerob atmosfære udskiftes den atmosfæriske luft med nitrogen, dette gøres ved at blæse nitrogen i serumflasken i 30 sek. derefter trækkes luften ud af væskefasen og omgivelser vha. vakuum i 30 sek, dernæst indblæses igen nitrogen i 30 sek proceduren gentages tre gange. Serumflaskerne lukkes med butyl gummipropper (apodan).
5. Der udtages prøver ved tiden 0, og de resterende serumflasker inkuberes i mørke ved 20° C på rystebord med 200 rpm. De aerobe forsøg kører i en periode op til ca. 10-20 dage og de anaerobe forsøg kører ca. 15-30 dage.
6. Der udtages dobbeltbestemmelse fra forsøgene.
7. Den biologiske aktivitet standses i prøverne ved at tørre dem i varmeovn ved 60° C.
8. Efter de 10-15 dages inkubering tilsættes yderligere 500 ng/ml, 1000 ng/ml eller 2000 ng/ml østrogen til de 2 x 10 stk. prøver for henholdsvis det aerobe og det anaerobe forsøg, som endnu ikke er udtaget.
9. Der udtages nu igen prøver, som beskrevet i pkt. 5., 6. og 7.
10. De tørrede prøver, som ønskes at ekstraheres, behandles som beskrevet i Bilag 2 *Ekstraktion af østrogen*.

Kontrolforsøg

1. 200 ml fjordvand autoklaveres og tilsættes 1000 ng/ml EE2
2. Der overføres 10 g autoklaveret sediment fra 0-2 cm dybde til 2 x 5 stk. 120 ml serumflasker.
3. Der tilføres 10 ml af det autoklaverede fjordvand til flaskerne med sediment, herefter følges fra og med pkt. 4 til pkt. 10 i ovenstående fremgangsmåde.

Rådata og beregninger fremgår af bilag 9 *Nedbrydning Skive Å* og bilag 10 *Nedbrydning Upåvirket* på cd-rom.

Bilag 5 Sorption af østrogener

Det undersøges, hvorvidt der er en sammenhæng mellem koncentrationen af EE2 og graden af sorption til sediment. Desuden undersøges sammenhængen mellem mængden af organisk stof i sedimentet og graden af sorption af EE2 til sedimentet, og sammenhængen mellem salinitet og sorption af EE2.

Forberedelser

Alle glasvarer glødes i 2-3 timer ved 450 ° C før brug, alle låg til pyrex glas skylles med hexan før brug.

Materialer

Varmeovn, 450° C

Engangs-centrifugeglas

C18-kolonner, Isolute SPE columns, 500 mg, C18, 6 ml

Rystebord

Autoklave

Glas pasteur pipette

Pyrex glas, 35 ml

Kemikalier

n-Hexan, purity ≥ 98,0 %, Merck

EE2, 17 α -ethinylestradiol, minimum 98 %, Sigma-Aldrich

Ethyl acetate, 1.09623.2500, purity ≥ 99,5 %, Merck

Fluka II (MTSFA)

Methanol, 1.06007.2500, purity ≥ 99,9 %, Merck

Ethanol 96 % vol, PH. EUR, De Danske Spritfabrikker

Acetone, 2-propanon, Merck

Kvælstof

Forsøgsbetingelser ved varierende indhold af EE2

Sedimentet til forsøgene er udtaget fra Skive Fjord i en dybde på 0-2 cm. Sedimentet har et organisk indhold på 0,69 % dw (målestation nr. 1), det opløses i fjordvand ligeledes udtaget i Skive Fjord. Der udføres fem forsøg, hvor tilførslen af EE2 er på henholdsvis 400 ng/ml, 600 ng/ml, 800 ng/ml, 1000 ng/ml og 1500 ng/ml. Forsøgene udføres med dobbeltbestemmelse. Sediment og fjordvand autoklaveres inden forsøgsstart, således at biologisk aktivitet stoppes. Forsøgene udføres ved stuetemperatur, 20 ° C. Forsøgene udføres med udgangspunkt i Ying *et al.*, 2003.

Fremgangsmåde

1. 4 g sediment afvejes i 10 sterile engangs-centrifugeflasker.
2. Der tilføres 40 ml fjordvand til hver.
3. EE2 tilføres de 5 x 2 centrifugeflasker i koncentrationer på henholdsvis 400, 600, 800, 1000 og 1500 ng/ml.
4. Sedimentopløsningerne bringes i ligevægt ved omrystning i minimum 16 timer.
5. Prøverne centrifugeres ved 3000 rpm i 30 minutter.
6. Supernatanten udtages med glas pasteur pipette til et 35 ml pyrex glas.
7. Dernæst filtreres opløsningen igennem en C18-kolonne, hvilket er beskrevet i bilag 2 *Ekstraktion af østrogener* pkt. 14 og herefter.
8. Den tilbageværende sediment-prøve tørres i varmeovn ved 60° C i ca. to døgn.
9. De tørrede prøver behandles, som det er beskrevet i Bilag 2 *Ekstraktion af østrogener* pkt. 1 og herefter.
10. Der laves kontrolprøver ligeledes i sterile engangs-centrifugeflasker, ved tilsætning af samme koncentrationer af EE2, men uden tilsætning af sediment, kontrolprøverne behandles efter samme princip som de almindelige prøver

Forsøgsbetingelser ved varierende indhold af organisk stof i sedimentet

For at opnå det varierende indhold af organisk stof, er sedimentet til forsøgene udtaget i 0-2 cm dybde ved tre stationer (målestation nr. 1, 4 og 19) i Skive Fjord. Sedimentet indeholder dermed henholdsvis 0,69 %; 3,2 % og 4,9 % organisk stof bestemt ud fra tørstof. Sedimentet opløses i fjordvand. Sediment og fjordvand autoklaveres inden forsøgsstart, således at biologisk aktivitet stoppes. Forsøgene udføres med dobbeltbestemmelse og ved stuetemperatur, 20 ° C. Forsøgene udføres med udgangspunkt i Ying *et al.*, 2003.

Fremgangsmåde

1. For hver type sediment afvejes 4 g i sterile engangs-centrifugeflasker.
2. Der tilføres 40 ml fjordvand til hver.
3. EE2 tilføres hver flaske i koncentrationen 800 ng/ml.
4. Sedimentopløsningerne bringes i ligevægt ved omrystning i minimum 16 timer.
5. Prøverne centrifugeres ved 3000 rpm i 30 minutter.
6. Supernatanten udtages og filtreres igennem en C18-kolonne, hvilket er beskrevet i Bilag 2 *Ekstraktion af østrogener* pkt. 14 og fremefter.
7. Sediment-prøven tørres i varmeovn ved 60° C i ca. to døgn.
8. De tørrede prøver behandles, som det er beskrevet i Bilag 2 *Ekstraktion af østrogener* pkt. 1 og fremefter.

Forsøgsbetingelser ved varierende salinitet

Sedimentet til forsøgene er udtaget i Skive Fjord (målestation nr. 1) i 0-2 cm dybde og har et organisk indhold på 0,69 % dw. Der udføres tre forsøg, hvor sedimentet opløses i enten fjord-hav- eller Åvand med en salinitet målt til henholdsvis 25,94 ‰, 33,42 og 0,344 ‰. Sediment og fjord-/hav- og Åvand autoklaveres inden forsøgsstart, således at biologisk aktivitet stoppes. Forsøgene udføres med dobbeltbestemmelses ved stuetemperatur, 20 ° C. Forsøgene udføres med udgangspunkt i Ying *et al.*, 2003.

Fremgangsmåde

1. 4 g sediment afvejes i sterile engangs-centrifugeflasker.
2. Der tilføres 40 ml af enten fjord-/hav/Åvand til hver.
3. EE2 tilføres hver flaske i koncentrationen 800 ng/ml.
4. Sedimentopløsningerne bringes i ligevægt ved omrystning i minimum 16 timer.
5. Prøverne centrifugeres ved 3000 rpm i 30 minutter.
6. Supernatanten udtages og filtreres igennem en C18-kolonne, som beskrevet i Bilag 2 *Ekstraktion af østrogener* pkt. 14 og fremefter.
7. Sedimentet tørres i varmeovn ved 60° C i ca. to døgn.
8. De tørrede prøver behandles, som det er beskrevet i Bilag 2 *Ekstraktion af østrogener* pkt. 1 og fremefter.

Bilag 6 Bestemmelse af kornstørrelsesfordeling og densitet

For at karakterisere sediment fra Skive Fjord bestemmes kornstørrelsesfordelingen.

Materialer

Foliebakke

Varmeovn 105° C

Måleglas 200 ml

Vægt

Sæt af sier med maskestørrelserne; 2,5 mm, 630 µm, 500 µm, 250 µm og 150 µm.

Fremgangsmåde

1. Afvej minimum 100 g. sediment i en foliebakke
2. Prøven tørres i varmeovn ved 105° C i minimum 2 timer
3. Prøven hældes i måleglasset og vægten af volumenet registreres
4. Prøven hældes gennem siene, som er placeret ovenpå hinanden med faldende maskestørrelse
5. Fraktionerne i de forskellige sier afvejes
6. kornstørrelsesfordelingen bestemmes ud fra den kumulerede fordeling af fraktionerne

Fraktionerne kan klassificeres efter International Soil Science Society (ISSS)

Ler	Silt	Fin	Grov	Grus
		Sand		
0,1 – 2 µm	2 µm – 20 µm	20 µm – 2 mm		> 2 mm

[Loll & Moldrup, 2000]

Appendiks A Gas Kromatografi

Alle prøver analyseres for østrogenindhold på gas kromatograf (GC). Ved bestemmelse af østrogenindholdet i naturlige prøver analyseres der desuden på GC-MS (Gas kromatograf- Masse spektroskopi). Ved gas kromatografi kan komplekse blandinger af stoffer separeres. Stofferne kvantificeres ved hjælp af standardkurver, hvor arealet, af de toppe stofferne giver, er proportionalt med koncentrationen af stoffet. Ved Masse-spektroskopi identificeres stofferne ved hjælp af ionisering af stofferne.

Gas kromatograf: Hewlet Packard series II plus 5890 Gas Chromatograph, med autosampler

Styreprogram: HP Chemstation

Prøvemængde: 2 µl

Kolonne: Fused capillary GC column 19091B -102 ultra 2 (serialnumber US4564727H)

Længde: 25 meter

Indre diameter: 0,2 mm

Indre film: 0,33 µm

Tryk: konstant 100 kPa

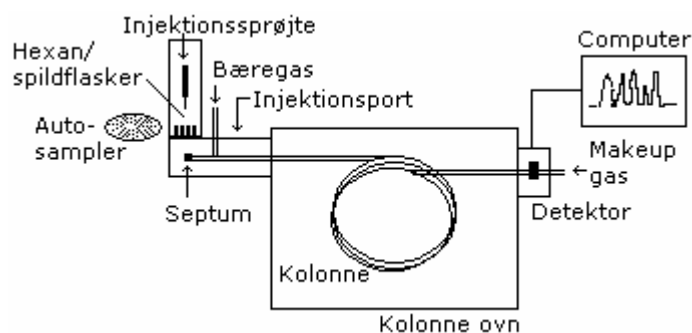
Bæregas: Brint

Makeup gas: Nitrogen

A.1 Opstart af gas kromatograf

Ved kørsel af prøver på gas kromatograf oprettes i programmet *HP Chemstation* den metode, man ønsker, at prøverne skal analyseres efter. Metoden indeholder oplysninger om, hvor stor prøvemængde der skal analyseres på, om der skal køres split eller splitless. Derudover indeholder metoden et temperatur-program, som prøven gennemgår, når den passerer kolonnen, se figur A2. Metoden indeholder ydermere oplysninger om, hvordan prøven injiceres med hensyn til, hvor mange gange injektionssprøjten skal skylles før og efter prøvetagning, så den er rensat til næste prøvetagning.

Derefter oprettes en sekvens for de prøver, man ønsker at måle på. Sekvensen indeholder blandt andet oplysninger om prøvernes identifikation, deres placering i autosampleren, hvilken metode man ønsker at analysere prøven ud fra, og hvor mange gange man ønsker at analysere prøven. Resultaterne fra en prøvekørsel ses som et kromatogram, se figur A3 og en rapport. Rapporten indeholder blandt andet retentionstiden for, hvornår det enkelte stof har passeret kolonnen, derudover er arealet angivet for hver enkelt top, stofferne giver. Figur A1 viser en principskitse over, hvordan den anvendte gas kromatograf er bygget op.



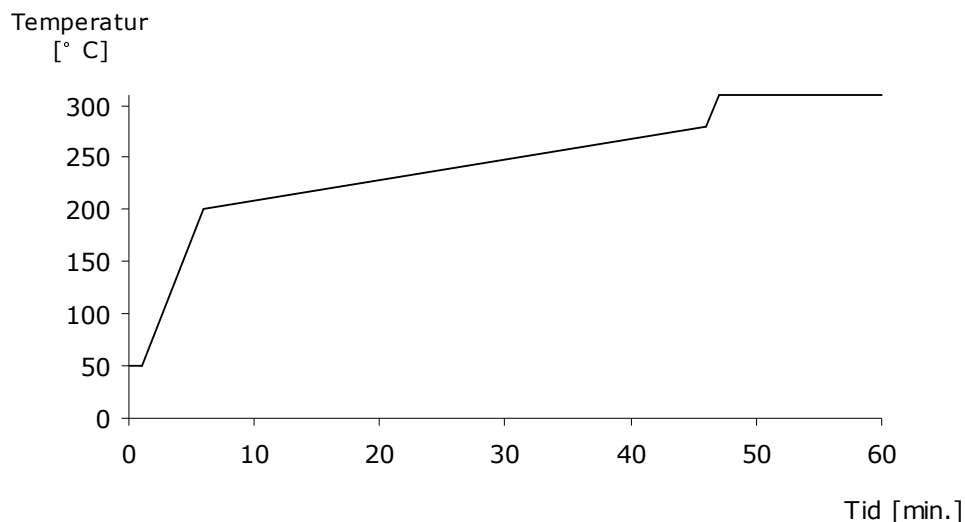
Figur A1 Principskitse af den anvendte gas kromatograf, efter [Harris, 2003].

A.2 Procedure for bestemmelse af østrogen på gas kromatograf

Proceduren er, at prøverne placeres i autosampleren, hvorefter metoden vælges, og sekvensen for prøverne oprettes. Injektionssprøjten skylles en gang med prøveopløsning og derefter udtages de 2 μl , som skydes igennem et septum ind i gas kromatografen. Herefter skylles injektionssprøjten 2 gange i hexan og er dermed klar til, at næste prøve skal skydes. Prøven kommer i gas kromatografen ind i injektionsporten, som er opvarmet til 280° C. Da metoden kører splitless opbevares prøven her i ca. 1 minut, hvor den varmes op og går på dampform. Derefter føres hele prøven videre af bære-gassen over i kolonnen. Hvis metoden var sat til at køre med split, ville kun en del af prøven blive ført ind i kolonnen.

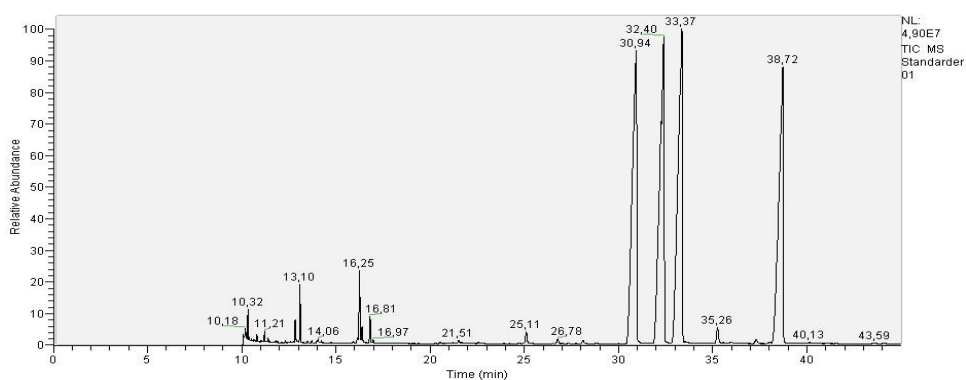
Splitless anvendes især ved prøver med lave koncentrationer af det stof, man ønsker at kvantificere [Harris, 2003].

Kolonnen er kun 50° C, når prøven føres ind. Det betyder, at prøven kondenseres igen. Kolonnen varmes nu gradvist op efter det temperaturprogram, der er bestemt i metoden, og prøven bringes tilbage på gasform. Figur A2 viser det temperaturprogram, som anvendes ved denne metode til analyse af østrogener.



Figur A2 Temperaturprogram til bestemmelse af østrogen på gas kromatograf.

Prøven bæres igennem kolonnen af bæregassen brint samtidig med, at temperaturen stiger. Trykket i kolonnen er konstant 100 kPa, hvilket medfører et varierende flow. Hermed adskilles de enkelte stoffer i prøven, og efterhånden registreres de ved detektoren. Detektoren er en flamme ioniseringsdetektor. Stofferne ledes direkte fra kolonnen og ind i detektoren. Samtidig ledes luft og nitrogen til detektoren. Luften medvirker til sammen med brint, at flammen brænder. Nitrogen betegnes makeup gas og tilføres for at bære prøven fra kolonnen over til flammen. Det er nødvendigt, da bæregassen kører med et flow, der er for lille til at sikre en god overførsel af stofferne til detektoren. I detektoren er en anode og en katode, hvor imellem der er en strøm af elektroner fra afbrændingen. Det er denne strøm af elektroner, der giver et signal om mængden af kulstof atomer, hvilket omsættes til mængden af det givne stof [Harris, 2003]. Resultatet gemmes på computeren og kan ses som et kromatogram, se figur A3.



Figur A3 Kromatogram med en kørsel af den interne standard, methyl tricosanoate og østrogenene; E1, E2 EE2. Retentionstiderne er henholdsvis 30,94; 32,40; 33,37 og 38,72.

I den sidste del af temperaturprogrammet er temperaturen sat til 310° C, dette sikrer, at alle stoffer fra injektionen kommer af søjlen, inden den næste prøve injiceres.

Ved hver enkelt prøve tilsættes en intern standard, som i dette tilfælde er methyl tricosanoate. Formålet med den interne standard er, at den har en kendt koncentration og genfindingsgraden, %REC kan bestemmes. Det vil sige, hvis den interne standard kvantificeres med 90 %, så justeres bestemmelsen af østrogenerne efter dette.

Der er udarbejdet en standardrække for østrogenene: E1, østron; E2, 17 β -estradiol; EE2, 17 α -ethinylestradiol og den interne standard, methyl tricosanoate. Standardrækkerne er lavet med koncentrationerne 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2500 ng/ml, 5000 ng/ml og 10.000 ng/ml. For nærmere oplysninger se bilag 1 *Standarder og Standardrække*.

A.3 Beskrivelse af kolonnen

Kolonnen er en 25 meter lang kapillær kolonne. Denne type kolonne er den mest anvendte ved analyser på gas kromatografi. Den er lavet af silica (SiO₂) overtrukket med polyimid, en type plastik som kan klare temperaturer op til 350° C. I forhold til pakkede kolonner, så har kapillære kolonner den fordel, at de har en større sensitivitet og opløselighed og en kortere analysetid. Omvendt har de en lavere prøvekapacitet end de pakkede kolonner. Kolonnens inderside er beklædt med en stationær film med en tykkelse på 0,33 μ m. Filmen består af (5 %)-Diphenyl- (95 %)-dimethyl siloxane copolymer. Ved valg af kolonne anvendes det princip, at den indre film har samme polaritet som det stof, der ønskes at måles på. Hvis en apolær kolonne anvendes til apolære stoffer, tilbageholdes det mest apolære stof længst i kolonnen. Hvis en apolær kolonne anvendes til polære stoffer, vil de mest flygtige stoffer gennemløbe kolonnen først [Harris, 2003]. Kolonnen i disse forsøg er forholdsvis apolær. På et polaritetsindeks fra 0 til 100, hvor 0 er de mest apolære ligger den på 8.

I injektionsporten er der en glasindsats, og her varmes prøven som sagt op til 280° C. Med et flow magen til det i kolonnen på ca. 1 ml/min ledes bæregassen af brint gennem glastrøret. Kolonnens starttemperatur ligger på 50° C, hvilket er lavere end prøvens kogepunkt, og derfor kondenseres den. I starten af kolonnen samles prøven, og efterhånden som bæregassen får fat, og kolonnetemperaturen øges, så fordampes prøven og ledes videre gennem kolonnen, indtil den når detektoren [Harris, 2003].

Kolonnens temperatur øges gennem separeringen af stofferne. Dette gøres for at øge damptrykket fra prøven og dermed nedsætte retentionstiden for stofferne. Hvis man anvendte en konstant temperatur, ville de mest flygtige stoffer komme ud først i en tæt rækkefølge, og de mindre flygtige stoffer vil enten komme sent på kromatogrammet eller slet ikke blive ført med ud.

Efterhånden som en kolonne er blevet brugt, kan noget af den indre film blive brændt af. Udsættelse for ilt ved høje temperaturer kan også nedbryde kolonnen. Dette medfører, at fænomenet *tailing* opstår. Normale toppe i kromatogrammet er høje og tynde, men ved *tailing* går toppen ikke lige ned til sidst, men danner ligesom en hale efter sig. For at reducere denne tendens er den indre film kovalent bundet til overfladen med silica, eller den er kovalent krydsbundet med sig selv. Dette styrker den indre films holdbarhed [Harris, 2003].

A.4 Gas Kromatograf – Masse Spektroskopi (GC-MS)

Ved anvendelse af GC-MS til analyse af prøver opnås både en kvantitativ og kvalitativ bestemmelse. Ved bestemmelse af østrogenindhold i de naturlige prøver er dette en fordel, så det sikres, at det rigtige stof findes.

Gas kromatograf - Masse Spektroskopi: Finnigan Trace GC 2000, Finnigan Trace MS, med autosampler

Styreprogram: Xcalibur

Prøvemængde: 2 µl

Kolonne: Chrompack capillary column, CP-sil 8 CB lowbleed/MS

Længde: 25 meter

Indre diameter: 0,2 mm

Indre film: 0,33 µm

Tryk: konstant 15,00 psi (Pounds per square inch ~ 6,89 kPa)

Bæregas: Helium

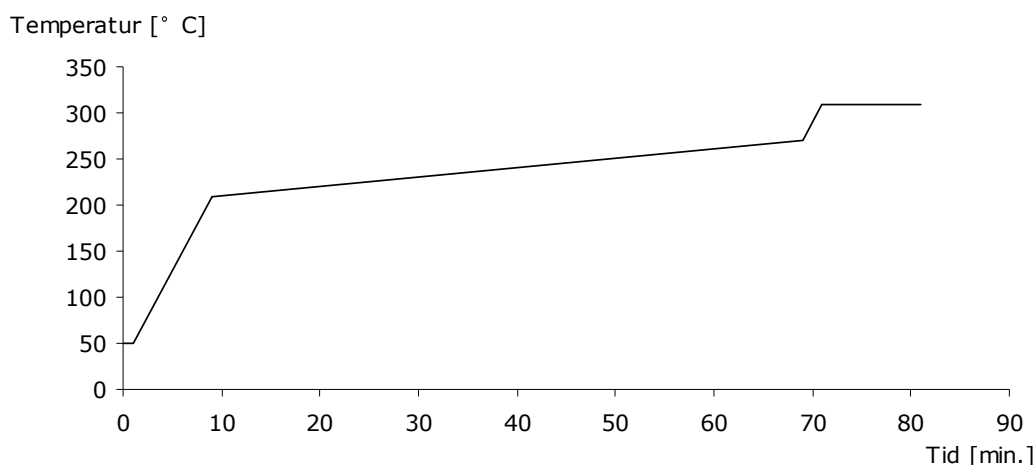
Detektor spænding: 350 volt

Princippet for anvendelsen af denne gas kromatograf er det samme som ved ovenstående. Der oprettes ligeliges en metode, som prøverne behandles efter og en sekvens med oplysninger om prøverne. For både GC og GC-MS er der anvendt den samme kolonne, der er blot den forskel, at de er købt ved forskellige fabrikanten og har derfor ikke samme navn.

Der er ikke anvendt den samme bæregas for GC og GC-MS. Dette har ingen betydning for præcisionen af målingerne, da de er lige anvendelige [Harris, 2003]. Forskellen er, at brint bevæges lidt hurtigere end helium, hvilket kommer til udtryk ved, at retentionstiderne for GC-MS er lidt længere end for GC.

A.5 Procedure for bestemmelse af østrogen på GC-MS

Ligesom ved kørsel på GC placeres prøverne i autosampleren, hvorefter metoden vælges, og sekvensen for prøverne oprettes. Injektionssprøjten skylles en gang med hexan og en gang i prøveopløsning. Herefter udtages 2 µl prøve, som skydes igennem septum ind i gas kromatografen. Herefter skylles injektionssprøjten 3 gange i hexan og er dermed klar til næste prøve skal skydes. Prøven kommer i gas kromatografen ind i injektionsporten, som er opvarmet til 220° C. Da metoden kører splitless opbevares prøven her i ca. 2 minutter, hvor den varmes op og går på dampform. Derefter føres hele prøven videre af bæregassen over i kolonnen. Når prøven kommer ind i kolonnen, er den kun 50° C, hvilket betyder, at prøven kondenseres igen. Kolonnen varmes nu gradvist op efter det temperaturprogram, der er bestemt i metoden, og prøven bringes tilbage på gasform. Figur A4 viser det temperaturprogram, som anvendes ved denne metode til analyse af østrogener.



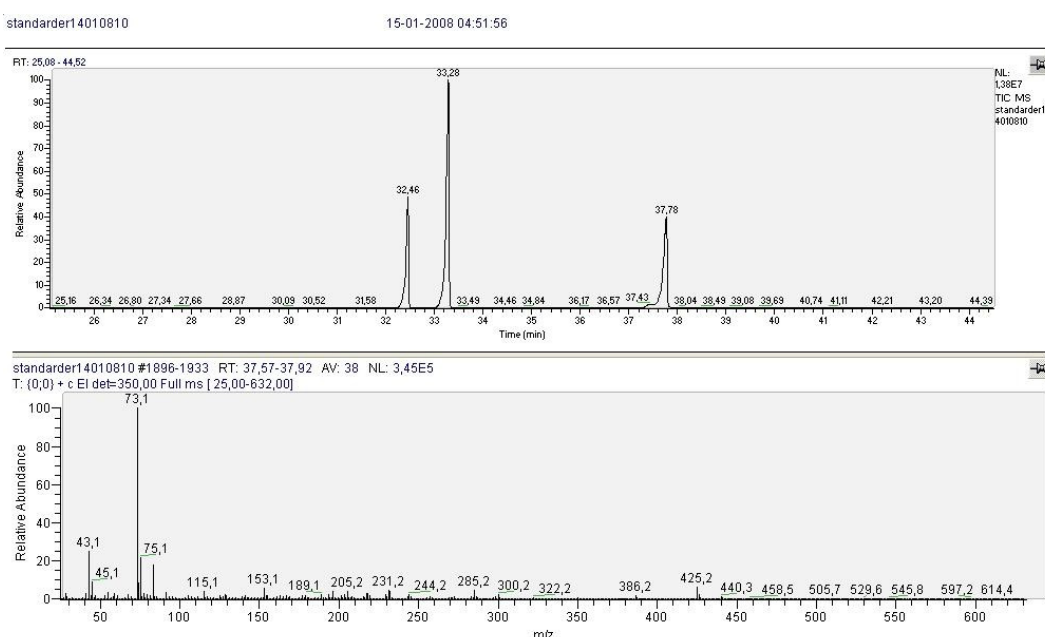
Figur A4 Temperaturprogram til bestemmelse af østrogen på GC-MS.

Prøven bæres igennem kolonnen af helium samtidig med, at temperaturen stiger. Trykket i kolonnen er konstant 15 psi, hvilket medfører et varierende flow. Hermed adskilles de enkelte stoffer i prøven. Prøven sendes fra kolonnen og direkte ind i masse – spektrometeret.

A.6 Masse-Spektroskopi

Masse-spektroskopi anvendes som detektor for gas kromatografi, således at der opnås både en kvantitativ og kvalitativ bestemmelse. Spektrometeret har en nøje selektivitet over for de stoffer,

der ønskes at blive analyseret. Dette mindsker nødvendigheden af en klar adskillelse af stofferne i gas kromatografen for at kunne kvalificere dem. Masse-spektroskopi er en teknik, hvor man undersøger stoffet ud fra massen af dets atomer, molekyler eller dele af molekylerne. Stofferne ledes fra gas kromatografen over i et ioniseringskammer på spektrometeret. Når stofferne ankommer hertil, er de stadig på gasform. Stofferne bliver ioniseret, og ionerne accelereres op således, at de adskilles fra hinanden. Adskillelsen sker i et elektrisk felt, og ionerne separeres efter forholdet mellem deres masse, m og deres ladning, z . Det vil eksempelvis sige, hvis alle ladninger var $+2$ så ville m/z forholdet for stofferne være halvdelen af massen. Resultatet fra spektrometeret fremkommer som et massespektrum med intensiteten fra molekylet eller atomet mod m/z forholdet [Harris, 2003]. Figur A3 viser et eksempel på et kromatogram øverst og et massespektrum nederst fra programmet Xcalibur.



Figur A3 Øverst, kromatogram med østrogenerne E1, E2 og EE2 vist fra venstre mod højre. Nederst, massespektrum for østroget EE2.

Ved ideelle betingelser ville arealet under toppene være proportionelt med mængden af atomet eller molekylet [Harris, 2003].

Når stofferne passerer overgangen fra gas kromatografi til masse spektroskopi, kan der opstå et problem i, at gas kromatografi foregår under tryk, hvilket masse spektroskopi ikke gør. Derfor kan der ophobes en mængde stof i denne overgang, når trykket falder, og der kan opstå kollisioner mellem molekylerne. Problemet undgås ved anvendelse af vacuum, og da kolonnen i gas kromatografen er tynd, er udledningen af stof fra denne ikke større, end at kapaciteten fra vacuum pumpen kan trække dem videre ind i spektrometeret [Harris, 2003].

Appendiks B Kvalitetskontrol af målinger på GC

Efter måling på gas kromatograf udvælges den eller de toppe, som svarer til det aktuelle stof. Dette gøres ud fra stoffets retentionstider. Der kan være usikkerheder forbundet med at udvælge det enkelte stof, og der kan være usikkerheder ved målingerne. Derfor foretages en kvalitetskontrol for at dokumentere, at resultaterne er korrekte. Kvalitetskontrollen er udført efter et notat om anvendelse af EPA (Environmental Protection Agency) metoder fra *Alltech*. Der beregnes relativ retentionstid, RRT, afvigelse fra middel relativ retentionstid og genfindingsgrad, %REC. Desuden kontrolleres kvaliteten af standardrækkerne ved beregninger af relativ retentionstid, RRT procentvis relativ standardafvigelse, %RSD og procentvis afvigelse, %D. I det følgende gennemgås kvalitetskontrollen af de anvendte standardrækker samt et eksempel på kvalitetskontrol af resultater. Kriterierne for kvalitetskontrollen er som følger;

- Relativ retentionstid, RRT må ikke afvige mere end +/- 0,006 minutter fra middel relativ retentionstid.
- Procentvis relativ standardafvigelse, %RSD skal ligge inden for +/- 20 %.
- Den procentvise afvigelse, %D skal ligge inden for +/- 15 %.
- Genfindingsgraden, %REC skal ligge mellem 80 % - 120 %.

[Alltech, 1997]

Standardrækkerne er lavet for den interne standard, IS og østrogenerne E1, E2 og EE2. De er lavet for koncentrationerne 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2500 ng/ml, 5000 ng/ml og 10.000 ng/ml. Målingerne er foretaget ved tripelbestemmelse, rådata og alle beregninger kan ses i bilag 12 *Standarder* på cd-rom. Gennemsnittet af retentionstider og arealer for hvert enkelt stof og koncentration vises i nedenstående tabeller, B1 – B6.

Tabel B1

Koncentration 100 ng/ml		
Stof	Retentionstid [min]	Areal
IS	27,219	7.771,6
E1	28,820	11.943,2
E2	29,452	14.109,4
EE2	33,241	12.307,9

Tabel B2

Koncentration 500 ng/ml		
Stof	Retentionstid [min]	Areal
IS	27,144	42.912,7
E1	28,747	58.591,7
E2	29,384	64.614,1
EE2	33,168	64.673,4

Tabel B3

Koncentration 1000 ng/ml		
Stof	Retentionstid [min]	Areal
IS	27,171	94.718,2
E1	28,782	136.290,7
E2	29,421	134.485,7
EE2	33,203	132.516,3

Tabel B4

Koncentration 2500 ng/ml		
Stof	Retentionstid [min]	Areal
IS	27,241	330.343
E1	28,835	357.829,3
E2	29,521	438.454
EE2	33,288	450.428,5

Tabel B5

Koncentration 5000 ng/ml		
Stof	Retentionstid [min]	Areal
IS	27,307	679.239,7
E1	28,943	1.128.435
E2	29,595	811.388,7
EE2	33,347	822.441,7

Tabel B6

Koncentration 10.000 ng/ml		
Stof	Retentionstid [min]	Areal
IS	27,426	1.355.760
E1	29,074	2.068.663
E2	29,770	1.676.327
EE2	33,497	1.694.640

Relativ Retentionstid, RRT

Den relative retentionstid angiver forholdet imellem retentionstiden for det aktuelle stof og retentionstiden for den interne standard. Den relative retentionstid beregnes således;

$$RRT = \frac{RT_{stof}}{RT_{IS}} \quad (B1)$$

hvor

RRT = Relativ Retentionstid

RT_{stof} = Retentionstiden for det aktuelle stof

RT_{IS} = Retentionstiden for den interne standard

[Alltech, 1997]

Nedenfor vises et beregningseksempel for EE2 med koncentrationen 10.000 ng/ml. Værdierne er taget fra tabel B6.

$$RRT = \frac{33,497}{27,426} = 1,221$$

Tabel B7 viser resultatet for beregning af RRT for alle stoffer.

Tabel B7

Stof	Relativ Retentionstid					
	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	2500 ng/ml	5000 ng/ml	10000 ng/ml
E1	1,059	1,059	1,059	1,059	1,060	1,060
E2	1,082	1,083	1,083	1,084	1,084	1,085
EE2	1,221	1,222	1,222	1,222	1,221	1,221

Middel Relativ Retentionstid

Den relative retentionstid for hvert stof og koncentration sammenlignes med middel relativ retentionstid. Den middel relative retentionstid beregnes således;

$$\overline{RRT} = \sum_{i=1}^n \frac{RRT}{n} \quad (B2)$$

hvor

\overline{RRT} = Middel relativ retentionstid

RRT = Retentionstiden for det aktuelle stof ved den aktuelle koncentration

n = antallet af koncentrationsniveauer

[Alltech, 1997]

Nedenfor vises et beregningseksempel for EE2 med koncentrationen 10.000 ng/ml. Værdierne er taget fra tabel B7.

$$\overline{RRT} = \frac{(1,221 + 1,222 + 1,222 + 1,222 + 1,221 + 1,221)}{6} = 1,222$$

Tabel B8 viser resultatet for beregning af middel relativ retentionstid for alle stoffer.

Tabel B8

Stof	Middel relativ retentionstid
E1	1,059
E2	1,083
EE2	1,222

Afvigelse fra middel relativ retentionstid

Det beregnes, hvor meget de relative retentionstider afviger fra middel relativ retentionstid, som det blev nævnt indledningsvist, må denne afvigelse ikke overskride +/- 0,006 [Alltech, 1997].

Tabel B9 viser resultatet for beregnede afvigelser fra middel relativ retentionstid.

Tabel B9

Stof	Afvigelse fra middel relativ retentionstid					
	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	2500 ng/ml	5000 ng/ml	10000 ng/ml
E1	0,000	0,000	0,000	0,001	- 0,001	- 0,001
E2	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	- 0,002
EE2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Det fremgår af tabel B9, at alle stoffer overholder kriteriet for afvigelse fra middel relativ retentionstid. For at kunne beregne den procentvise relative standard afvigelse, % RSD foretages først beregninger af den relative responsfaktor.

Relativ Respons Faktor, RRF

Den relative respons faktor beregnes ved hjælp af følgende ligning;

$$RRF = \frac{A_{stof} \cdot C_{IS}}{A_{IS} \cdot C_{stof}} \quad (B3)$$

hvor

A_{stof} = Arealet af det aktuelle stof

A_{IS} = Arealet af den interne standard

C_{stof} = koncentrationen af det aktuelle stof

C_{IS} = koncentrationen af den interne standard

[Alltech, 1997]

Nedenfor vises et beregningseksempel for EE2 med koncentrationen 10.000 ng/ml og den interne standard med koncentrationen 10.000 ng/ml. Værdierne er taget fra tabel B6.

$$RRF = \frac{1.694.640 \cdot 10.000}{1.355.760 \cdot 10.000} = 1,250$$

Tabel B10 viser resultaterne for beregning af relativ respons faktor.

Tabel B10

Stof	Relativ Respons Faktor					
	100 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	2500 ng/ml	5000 ng/ml	10000 ng/ml
E1	1,537	1,365	1,439	1,083	1,661	1,526
E2	1,826	1,506	1,420	1,327	1,195	1,236
EE2	1,584	1,507	1,399	1,364	1,211	1,250

Middel Relativ Respons Faktor

Herefter beregnes middel relativ respons faktor efter følgende ligning;

$$\overline{RRF} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n} \quad (B4)$$

hvor

\overline{RRF} = Middel relativ respons faktor

X_i = RRF for det aktuelle stof ved den aktuelle koncentration

n = antallet af koncentrationsniveauer

[Alltech, 1997]

Tabel B11 viser resultatet for beregning af middel relativ responsfaktor for alle stoffer.

Tabel B11

Stof	Middel relativ respons faktor
E1	1,435
E2	1,418
EE2	1,386

Standardafvigelse for den relative respons faktor, SD_{RRF}

For at kunne beregne den procentvise relative standardafvigelse, %RSD er det nødvendigt først at beregne standardafvigelsen for den relative respons faktor, SD_{RRF} . Standardafvigelsen beregnes ved følgende ligning;

$$SD_{RRF} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(RRF_i - \overline{RRF})^2}{N-1}} \quad (B5)$$

hvor

SD_{RRF} = Standardafvigelsen for den relative respons faktor for det aktuelle stof

RRF_i = Relativ respons faktor for det aktuelle stof ved en aktuell koncentration

\overline{RRF} = Middel relativ respons faktor for det aktuelle stof

N = antallet af koncentrationsniveauer

[Alltech, 1997]

Nedenfor vises et beregningseksempel for standardafvigelsen for den relative respons faktor.

Beregningen er foretaget for EE2, og de anvendte værdier er taget fra tabel B10 og tabel B11.

$$SD_{RRF} = \sqrt{\frac{(1,584 - 1,386)^2 + (1,507 - 1,386)^2 + (1,399 - 1,386)^2 + (1,364 - 1,386)^2 + (1,211 - 1,386)^2 + (1,250 - 1,386)^2}{6-1}} = 0,052$$

Tabel B12 viser resultatet for beregning af standardafvigelsen for den relative responsfaktor, SD_{RRF} for alle stofferne.

Tabel B12

Stof	SD _{RRF}
E1	0,058
E2	0,101
EE2	0,052

Procentvis relativ standardafvigelse, % RSD

Med ovenstående beregninger kan den procentvise relative standardafvigelse nu beregnes;

$$\%RSD = \frac{SD_{RRF}}{\overline{RRF}} \cdot 100 \quad (B6)$$

hvor

%RSD = procentvis relativ standardafvigelse

SD_{RRF} = Standardafvigelsen for den relative respons faktor for det aktuelle stof

\overline{RRF} = Middel relativ respons faktor for det aktuelle stof

[Alltech, 1997]

Nedenfor vises et beregningseksempel for procentvis relativ standardafvigelse. Eksemplet er beregnet for EE2, værdierne er taget fra tabel B11 og tabel B12.

$$\%RSD = \frac{0,052}{1,386} \cdot 100 = 3,79$$

Tabel B13 viser resultatet for beregninger af procentvis relativ standardafvigelse, %RSD.

Tabel B13

Stof	% RSD
E1	4,04
E2	7,14
EE2	3,79

Kriteriet for den procentvise relative standardafvigelse er som nævnt +/- 15 % [Alltech, 1997]. Det fremgår af tabel B13, at alle tre stoffer overholder dette kriterium.

Procentvis afvigelse, %D

Gas kromatografen kan over en periode gradvist ændre målepræcision. Dette skyldes blandt andet, at flamme-ioniseringsdetektoren med tiden kan blive sodet til. Derfor foretages en kvalitetskontrol ved at beregne den procentvise afvigelse, %D for nye målinger af standarderne. De nye målinger er foretaget med dobbeltbestemmelse for standarder med koncentrationen 5000 ng/ml. Mellem den første måling af standardrækkerne til anden måling er der 37 dage. Resultatet af de nye målinger er vist i tabel B14 som et gennemsnit af retentionstider og arealer.

Tabel B14

Koncentration 5000 ng/ml		
Stof	Retentionstid [min]	Areal
IS	27,569	546.952
E1	29,236	844.930
E2	29,908	813.538,5
EE2	33,653	786.973

Ved sammenligning af tabel B14 med tabel B5 kan det ses, at retentionstiderne ligger lidt senere ved de sidste målinger end ved de første målinger. Desuden kan det ses, at arealet af toppene er lidt lavere ved de sidste målinger end ved de første målinger. Den procentvise afvigelse, %D beregnes for at vurdere, om disse ændringer er for store til, at de sidste målinger kan betragtes som brugbare.

$$\%D = \frac{RRF_{\text{stof}} - \overline{RRF}}{\overline{RRF}} \cdot 100 \quad (B7)$$

hvor

RRF_{stof} = Relativ respons faktor for det aktuelle stof fra de nye målinger

\overline{RRF} = Middel relativ responsfaktor for det aktuelle stof fra de første målinger

[Alltech, 1997]

Nedenfor vises et beregningseksempel for den procentvise afvigelse, %D for EE2. Værdierne i beregningen er taget fra tabel B11 og B14.

$$RRF_{EE2} = \frac{786.973 \cdot 5000}{546.952 \cdot 5000} = 1,439$$

$$\%D = \frac{1,439 - 1,386}{1,386} \cdot 100 = 3,84$$

Tabel B15 viser resultatet for beregninger af den relative respons faktor, RRF for de nye målinger og den procentvise afvigelse, %D.

Tabel B15

Stof	RRF, nye målinger	%D
E1	1,545	7,63
E2	1,487	4,87
EE2	1,439	3,84

Det blev nævnt indledningsvist, at kriteriet for den procentvise afvigelse ligger på +/- 15 % [Alltech, 1997]. Det fremgår af tabel B15, at dette kriterium overholdes for alle stoffer.

Gennem denne kvalitetskontrol af standarddrækker og målinger på gas kromatograf kan det konstateres, at alle kriterier overholdes, og målingerne kan betragtes som anvendelige.

Kvalitetskontrol af målinger fra forsøg

Målinger fra forsøgene kontrolleres ved at beregne den relative retentionstid, RRT som vist ovenfor. Dernæst bestemmes afvigelsen fra middel relativ retentionstid, og det sikres, at målingerne overholder kriteriet på +/- 0,006. Derudover bestemmes genfindingsgraden, %REC for den interne standard. Kriteriet for genfindingsgraden er som nævnt ovenfor mellem 80 % - 120 % [Alltech, 1997]. Genfindingsgraden beregnes således;

$$\%REC = \frac{Konc_{obs}}{Konc_{forv}} \cdot 100 \quad (B8)$$

hvor

%REC = Genfindingsgraden

Konc_{obs} = den observerede koncentration af det tilsatte stof

Konc_{forv} = den forventede koncentration af det tilsatte stof

[Alltech, 1997]

Nedenstående tabel B16 viser den observerede koncentration for den interne standard og den beregnede genfindingsgrad, %REC. Den interne standard er tilsat i koncentrationen 500 ng/ml. Prøverne er fra forsøget med nedbrydning af EE2 tilsat som 2000 ng/ml. Forsøget er foretaget i sediment udtaget ved Skive Å og under aerobe forhold.

Tabel B16

Prøve	Koncentration, observeret	Genfindingsgrad, %REC
A	646,1	129,2
AA	702,4	140,5
B	608,5	121,7
BB	621,7	124,3
C	662,3	132,5
CC	594,9	119,0
D	604,9	121,0
DD	646,9	129,4
E	638,0	127,6
EE	635,6	127,1
F	725,3	145,1
FF	612,0	122,4
G	698,0	139,6
GG	731,8	146,4
H	725,5	145,1
HH	601,4	120,3
I	712,2	142,4
II	557,7	111,5
J	522,3	104,5
JJ	577,6	115,5

Nedenfor vises et beregningseksempel for genfindingsgraden. Værdierne er taget fra tabel B16, prøve A.

$$\%REC = \frac{646,1}{500} \cdot 100 = 129,2$$

Det fremgår af tabel B16, at ikke alle prøver ligger indenfor kriteriet 80 % - 120 %. Da forsøgene udgør målinger på spikede prøver, antages det ikke at have væsentlig betydning, at genfindingsgraden, %REC for den interne standard ligger højt. Ved måling af naturlige koncentrationer bør kriteriet overholdes. Desuden er kriteriet 80 % - 120 % kun et eksempel fra EPA. Det er også muligt at finde rapporter, hvor kriteriet er et bredere interval.